

**Auswirkungen der maternalen HIV-1-Infektion auf die  
Genexpression endothelialer Vorläuferzellen und  
differenzierter Endothelzellen nicht-infizierter Kinder**

**Dissertation**

**Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**vorgelegt von**

**Anita Jörg**

**März 2004, München**

---

Die Arbeit wurde in der Abteilung Virale Vaskulopathie (Leitung Prof. Dr. Michael Stürzl), des  
Instituts für Molekulare Virologie am GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit  
in Neuherberg, durchgeführt

1. Gutachter:	PD Dr. Ruth Brack-Werner
2. Gutachter:	PD Dr. Brian Salmons
Sondergutachter:	Prof. Dr. Michael Stürzl
Tag der mündlichen Prüfung:	28.07.2004

Inhaltsangabe

Abkürzungen	5
Zusammenfassung	8
1 Einleitung	10
1.1 Pathologische Gefäßveränderungen bei HIV-1-infizierten Patienten	10
1.1.1 Ätiologie und Pathogenese des Kaposi-Sarkoms	11
1.1.2 Kardiovaskuläre Manifestation der HIV-1-Infektion	12
1.2 Molekulare Mechanismen der Endothelzellaktivierung durch HIV-1	13
1.3 Embryonale Vaskulogenese	15
1.4 Angiogenese	18
1.5 Regulatoren der Angiogenese	19
1.6 Postnatale Vaskulogenese und endotheliale Vorläuferzellen	20
1.7 Heterogenität des Endothels	22
1.8 Charakteristische Endothelzellmarker zur Klassifizierung von quieszentem und aktiviertem Endothel	24
1.8.1 Konstitutiv exprimierte Endothelzellmarker	25
1.8.2 Induzierbare Endothelzellmarker	28
1.9 Das humane Guanylat-Bindungsprotein-1	29
2 Fragestellung und Zielsetzung	31
3 Ergebnisse	32
3.1 Isolierung von humanen Endothelzellen	32
3.1.1 Etablierung der Isolierung und Kultivierung von CD34-positiven endothelialen Vorläufer-Zellen (EPC) aus Nabelschnurblut	32
3.1.2 Isolierung von differenzierten Endothelzellen aus der Nabelschnur	34
3.2 Vergleich der Morphologie von EPC und HUVEC der HIV-1- und der N-Gruppe	36
3.3 Lebensdauer von HUVEC, HUAEC, EPC und HMVEC	37
3.4 Die Kapillarbildungsfähigkeit von EPC und HUVEC wird von der HIV-1- Infektion der Mutter nicht beeinflusst	40
3.5 Nachweis charakteristischer Endothelzellmarker in EPC, HUVEC und HMVEC	41

3.5.1	Expression konstitutiv exprimierter Endothelzellmarker (CD31, CD105) und der Aufnahme von acetyliertem <i>Low Density</i> Lipoprotein	42
3.5.2	Expression von ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin und vWF in HUVEC, EPC und HMVEC nach Stimulation mit inflammatorischen Zytokinen	44
3.6	Identifizierung differentiell exprimierter Gene in HUVEC und EPC von Kindern der HIV-1- und der N-Gruppe	48
3.7	RT-PCR-Analyse der Expression verschiedener MMPs in HUVEC, HUAEC und EPC	51
3.8	Nachweis der differentiellen MMP-1-Expression auf Proteinebene	53
3.8.1	<i>Western Blot</i> -Analyse zum Nachweis der MMP-1-Expression	53
3.8.2	Immunfluoreszenz-Nachweis der MMP-1-Expression auf Einzelzell-Ebene in HUVEC, HUAEC und EPC	57
3.9	Aktivitätsnachweis von MMP-1 in HUVEC und EPC der HIV-1- und der N-Gruppe mittels Zymografie	59
3.10	Zwischenzusammenfassung der vergleichenden Analyse differenzierter Endothelzellen und EPC von Kindern HIV-1-infizierter Mütter mit Kontrollzellen von Kindern nicht-infizierter Mütter	60
3.11	Sequenzanalyse des MMP-1-Promotors in HUVEC von Kindern der HIV-1- und der N-Gruppe	62
3.12	Azidothymidin hat keinen Einfluss auf die MMP-1-Expression	65
3.13	GBP-1 vermittelt die Hemmung der MMP-1-Expression durch inflammatorische Zytokine	67
3.14	Die reduzierte MMP-1-Expression in Endothelzellen von Kindern der HIV-1-Gruppe ist nicht in einer erhöhten GBP-1-Expression begründet	70
4	Diskussion	74
4.1	Isolierung und Kultivierung von EPC aus dem Nabelschnurblut sowie von differenzierten Endothelzellen aus der Nabelschnurvene und -arterie	74
4.2	HUVEC, HUAEC und EPC von Kindern der HIV-1- und der N-Gruppe unterscheiden sich nicht hinsichtlich funktioneller Kriterien und charakteristischer Marker	77
4.3	Spezifischer Einfluss der maternalen HIV-1-Infektion auf die Expression von MMP-1	79

4.4	Ursachen und Mechanismen der reduzierten MMP-1-Expression in Endothelzellen von Kindern HIV-1-positiver Mütter	82
4.5	Klinische Relevanz der MMP-1-Repression in Endothelzellen von Kindern der HIV-1-Gruppe	84
5	Material und Methoden	86
5.1	Material	86
5.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	86
5.1.2	Antikörper	87
5.1.2.1	Primäre monoklonale Antikörper	88
5.1.2.2	Sekundärantikörper	88
5.1.3	Radiochemikalien	89
5.1.4	Enzyme	89
5.1.5	Biologisches Material	89
5.1.6	Geräte	90
5.2	Methoden	90
5.2.1	Allgemein benötigte Puffer, Lösungen und Medien	90
5.2.2	Zellbiologische Methoden	91
5.2.2.1	Allgemeine Zellkultur	91
5.2.2.2	Isolierung von PBMZ aus dem Blut	93
5.2.2.3	Isolierung und Kultivierung von EPC aus der PBM-Zellfraktion	94
5.2.2.4	Isolierung von Endothelzellen aus der Nabelschnur	96
5.2.2.5	Untersuchungen der Morphologie von EPC und HUVEC	96
5.2.2.6	Langzeitkultivierung von HUVEC, HUAEC, EPC und HMVEC	96
5.2.2.7	Morphologische Untersuchungen von HUVEC und EPC auf Matrigel	97
5.2.2.8	Immunzytochemische Färbungen zum Nachweis von MMP-1, CD31, CD105, ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin und vWF	97
5.2.2.9	Nachweis der Aufnahme von Dil-Ac-LDL	98
5.2.2.10	Produktion infektiöser retroviraler Partikel	99
5.2.2.11	Transduktion von HUVEC	100
5.2.3	Proteinchemische Methoden	100
5.2.3.1	Quantitative Proteinbestimmung der RIPA-Extrakte nach Bradford	100
5.2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	101

5.2.4	Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	103
5.2.4.1	Elektrotransfer von Proteinen	103
5.2.4.2	<i>Western Blot</i> -Analyse	104
5.2.4.3	Herstellung von Proteinextrakten aus eukaryontischen Zellen	105
5.2.4.4	Zymografie	105
5.2.5	DNA-Technologie	106
5.2.5.1	Isolierung genomischer DNA aus Endothelzellen	106
5.2.5.2	Fällung der genomischen DNA mit Ethanol	107
5.2.5.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	107
5.2.5.4	Nichtdenaturierende Agarose-Gelelektrophorese	108
5.2.5.5	Synthetische Oligonukleotide	108
5.2.5.6	Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	110
5.2.5.7	Polymerasekettenreaktion (PCR) der genomischen DNA	111
5.2.5.8	Analyse des Methylierungsstatus der genomischen DNA	111
5.2.6	RNA-Technologie	112
5.2.6.1	Isolierung gesamtzellulärer RNA aus eukaryontischen Zellen	112
5.2.6.2	DNase Behandlung der gesamtzellulären RNA	112
5.2.6.3	Phenol/Chloroform-Behandlung und Fällung der RNA	113
5.2.6.4	Fällung der RNA	113
5.2.6.5	Nichtdenaturierende Elektrophorese von RNA	113
5.2.6.6	Herstellen einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde	114
5.2.6.7	Reinigung der radioaktiv markierten Sonden	114
5.2.6.8	Bestimmung der spezifischen Aktivität radioaktiv markierter cDNA	115
5.2.6.9	cDNA Hybridisierung der Atlas Membran (Clontech, Atlas <sup>TM</sup> Human 1.2 Array)	115
5.2.6.10	<i>Strip-wash</i>	116
6	Literatur	117
7	Lebenslauf und Publikationsliste	141
8	Danksagung	144

## Abkürzungen

AS-GBP-1	<i>antisense</i> -GBP-1 mRNA
AZT	Azidothymidin
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
cDNA	<i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindolhydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dil-Ac-LDL	acetyliertes, humanes <i>Low Density</i> Lipoprotein, markiert mit rot-fluoreszierendem 1,1'-dioctadecyl3,3',3',3'-tetramethylindocarbocyanine Perchlorat (Dil)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidphosphat
FKS	Fötales Kälberserum
EBM	Endothelzellbasalmedium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPC	<i>Endothelial Precursor Cells</i> , endotheliale Vorläuferzellen
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase
GBP-1	Guanylat-Bindungsprotein-1
HAART	Hochaktive antiretrovirale Kombinationstherapie
HHV-8	humanes Herpes Virus-8
HIV-1	<i>human immunodeficiency virus-1</i>
HMVEC	humane mikrovaskuläre Endothelzellen
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	destilliertes und deionisiertes Wasser
HUAEC	<i>Human Umbilical Artery Endothelial Cells</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial cells</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL-1 $\alpha$	Interleukin-1 $\alpha$
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
LYVE-1	<i>lymphatic vessel endothelial HA receptor</i>

kDa	Kilo-Dalton
KS	Kaposi Sarkom
LSM	Laser Scanning Mikroskop
mA	Milliampere
mg	Milligramm
Min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
nt	Nukleotid
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBMZ	Periphere mononukleäre Zellen des Blutes
PFA	Paraformaldehyd
PIGF	<i>Placenta Growth Factor</i>
PS	Pferdeserum
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Sodium Docedyl Sulfat
Sek	Sekunden
SNP	<i>Single Nucleotide</i> -Polymorphismen
Std.	Stunden
TGF-β	<i>transforming growth factor</i> -β
TNFα	Tumornekrose Faktor-α
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin



V	Volt
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vWF	von Willebrand Faktor

## Zusammenfassung

HIV-1-infizierte Patienten leiden häufig unter krankhaften Veränderungen des Endothels, die zu funktionellen Störungen des Gefäßsystems, koronaren Herzerkrankungen und zu Tumoren führen können. Bemerkenswert ist, dass auch Kinder HIV-1-infizierter Frauen eine signifikant schlechtere Herzfunktion und somit ein erhöhtes Risiko für koronare Herzerkrankungen aufweisen, selbst wenn diese Kinder nicht mit dem Virus infiziert sind. Um zu untersuchen, ob die Ursache für diese Auffälligkeit eine Störung der Endothelzellen ist, wurden differenzierte Endothelzellen der Nabelschnurvene oder -arterie (HUVEC, HUAEC) und zirkulierende endotheliale Vorläufer-Zellen (EPC) aus der Stammzellfraktion des Nabelschnurblutes von nicht-infizierten Kindern HIV-1-infizierter Mütter (HIV-1-Gruppe) untersucht. Als Kontrolle wurden HUVEC und EPC von Kindern nicht-infizierter Mütter (N-Gruppe) getestet.

Aufgrund der geringen verfügbaren Mengen an Nabelschnurblut wurden für die Untersuchungen ausschließlich EPC-Langzeitkulturen eingesetzt. Dazu wurde zunächst die Isolierung und Kultivierung der Zellen etabliert. Alle Zellkulturen der HIV-1- und der N-Gruppe exprimierten die Endothelzellmarker CD31, CD105 und den *Scavenger* Rezeptor I zur Aufnahme von acetyliertem *Low Density* Lipoprotein. Nach Stimulation mit inflammatorischen Zytokinen konnte die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin sowie die Sekretion des intrazellulär gespeicherten von Willebrand Faktors induziert werden. Des weiteren wurden keine Unterschiede in der Morphologie, den Wachstumseigenschaften und der Fähigkeit zur Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen in Matrigel beobachtet. Allerdings zeigte der molekularbiologische Vergleich der Genexpression mittels *Makroarray* (1176 Gene), dass in Endothelzellen von Kindern HIV-1-infizierter Mütter die Expression von Matrix-Metalloprotease-1 (MMP-1) unter der Nachweisgrenze liegt oder signifikant reduziert ist. Dies konnte auf RNA- und Proteinebene sowie mittels Gelatine-Zymografie bestätigt werden.

Als Ursache für die reprimierte Expression von MMP-1 konnten Mutationen und ein veränderter Methylierungsstatus des proximalen Promotors, der für die Induzierbarkeit des Gens eine wichtige Rolle spielt, ausgeschlossen werden. Ferner war kein Zusammenhang zwischen der inhibierten MMP-1-Expression und einer

verstärkten GBP-1-Expression, wie es für inflammatorische Prozesse beschrieben ist, nachweisbar.

In dieser Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass sowohl in differenzierten Endothelzellen als auch in EPC-Langzeitkulturen von Kindern HIV-1-infizierter Mütter die Expression von MMP-1 gehemmt ist. Dies könnte in einem Zusammenhang mit der Beobachtung stehen, dass Kinder HIV-1-infizierter Mütter, unabhängig von ihrem HIV-1-Status, signifikant schlechtere Herzfunktionen haben.

## 1 Einleitung

1983 identifizierten die Arbeitsgruppen von Luc Montagnier und Robert C. Gallo erstmals das humane Immundefizienzvirus-1 (HIV-1) als Erreger des erworbenen Immunschwächesyndroms (AIDS) (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1983). Seitdem kam es zu einer pandemischen Ausbreitung von HIV-1 mit derzeit weltweit mehr als 40 Millionen HIV-Infizierten, wovon die Mehrzahl in Afrika, Süd- und Südostasien lebt (UNAIDS, 2003).

### 1.1 Pathologische Gefäßveränderungen bei HIV-1-infizierten Patienten

Neben opportunistischen Infektionen leiden HIV-1-infizierte Patienten häufig unter krankhaften Veränderungen des Endothels, die zu funktionellen Störungen des Gefäßsystems führen können. Die häufig auftretenden Gefäßveränderungen von AIDS-Patienten werden auf eine chronische Aktivierung des Endothels zurückgeführt (Calabrese *et al.*, 1989; Zietz *et al.*, 1996). Beispiele für Vaskulopathien, die im Zusammenhang mit HIV-1 vermehrt auftreten sind Schädigungen des Aortenendothels (Zietz *et al.*, 1996), der Koronararterien (Passalaris *et al.*, 2000) und der Blut-Hirn-Schranke (Petito und Cash, 1992). Darüber hinaus ist das Risiko von HIV-1-infizierten Patienten, an einem AIDS-assoziierten Kaposi-Sarkom (AIDS-KS) zu erkranken, bis zu 20 000 mal höher als das nicht-infizierter Personen (Hengge *et al.*, 2002).

Die auftretenden Störungen zeigen sich in einer verstärkten Gefäßpermeabilität, die zu einem vermehrten Austritt von Flüssigkeit aus dem Gefäßsystem und zur Ödembildung führt (Ziegler, 1993). Außerdem wird eine erhöhte Proliferationsrate der Endothelzellen beobachtet, die durch die Regeneration des Endothels induziert sein könnte und das Risiko für Tumorerkrankungen wie dem AIDS-KS steigert (Ensoli *et al.*, 2001). Des weiteren wird eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen beobachtet, was zur Anlagerung von Immunzellen führt, die durch die Sezernierung bestimmter Faktoren die Schädigungen des Endothels verstärken können (Lafrenie *et al.*, 1997; Zietz *et al.*, 1996).

Im folgenden Abschnitt werden als Beispiele für die klinische Relevanz der bei AIDS-assoziierten Gefäßveränderungen das KS und kardiovaskuläre Erkrankungen dargestellt.

### 1.1.1 Ätiologie und Pathogenese des Kaposi-Sarkoms

Das KS lässt sich in vier klinisch-epidemiologische Gruppen einteilen: Die wenig aggressive klassische Form tritt vorwiegend im Mittelmeerraum und Osteuropa bei älteren Männern über 50 Jahre auf. Das Afrikanische KS kommt gehäuft in Zentralafrika vor und macht dort bis zu 10% der diagnostizierten Tumorerkrankungen aus (Taylor *et al.*, 1972). Bei Transplantationspatienten, die mit immunsuppressiven Medikamenten behandelt werden, wird das iatrogene KS beobachtet (Trattner *et al.*, 1993). Das AIDS-assoziierte KS ist die aggressivste Form des KS und der am häufigsten auftretende Tumor bei HIV-1-Patienten (Haverkos und Drotman, 1985).

Das KS setzt sich hauptsächlich aus Endothelzellen, infiltrierten Monozyten und Lymphozyten zusammen (Ensoli *et al.*, 2001; Stürzl *et al.*, 2001). Neben deregulierten Onkogenen und Tumorsuppressorgenen spielt zusätzlich die Infektion mit einem weiteren Virus, dem Humanen Herpesvirus-8 (HHV-8), für das Fortschreiten der Erkrankung eine unabdingbare Rolle.

Die Entwicklung des KS erfolgt in drei Stadien: Zu Beginn der Erkrankung tritt das *Patch-* (Fleck-) Stadium auf, das histologisch durch unregelmäßige, dilatierte Gefäße mit infiltrierten Monozyten und T-Zellen gekennzeichnet ist (Ackerman, 1979). Danach folgt das *Plaque-* (Linsen-) Stadium, in dem in den KS-Läsionen erstmals spindelförmige Zellen (KS-Spindelzellen) auftreten, die als die eigentlichen Tumorzellen gelten. Das Endstadium ist das *noduläre-* (knotige-) Stadium. In diesem Stadium sind die KS-Spindelzellen, die in bündelförmigen Strukturen organisiert sind, der häufigste Zelltyp. Die Basallamina der KS-Gefäße ist fragmentiert, Perizyten fehlen (McNutt *et al.*, 1983).

Die Charakterisierung der Spindelzellen aus KS-Läsionen zeigte, dass ein Großteil der Zellen Endothelzellmarker wie CD31 und CD34 exprimieren (Stürzl *et al.*, 2001), aber auch Marker, die für Makrophagen (CD68) (Fiorelli *et al.*, 1998), dendritische Zellen (Faktor XIIIa) (Huang *et al.*, 1997) und glatte Muskelzellen (*smooth muscle alpha-actin*) charakteristisch sind (Weich *et al.*, 1991).

Interessanterweise konnten aus dem Blut von HIV-1-infizierten Patienten mit AIDS-KS zirkulierende Zellen isoliert werden, die in der Morphologie und in mehreren charakteristischen Markern den AIDS-KS-Spindelzellen ähnlich waren (Browning *et al.*, 1994). Dabei korrelierte eine signifikant erhöhte Anzahl der zirkulierenden Zellen

mit dem Auftreten eines AIDS-KS, beziehungsweise mit dem erhöhten Risiko an einem KS zu erkranken (Browning *et al.*, 1994).

### **1.1.2 Kardiovaskuläre Manifestation der HIV-1-Infektion**

Bei HIV-1-positiven Patienten wurden zahlreiche arteriosklerotische Veränderungen der Koronargefäße nachgewiesen (Passalaris *et al.*, 2000). Untersuchungen an Koronarpräparaten ergaben, dass massive Gefäßverengungen das Lumen der Gefäße bis zu 80% einengten und in den betroffenen Bereichen eine erhöhte Expression von Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) auftrat (Tabib *et al.*, 2000). Morphologische Befunde zeigten, dass die Läsionen bei HIV-1-Patienten als eine Zwischenstufe herkömmlicher arteriosklerotischer Veränderungen und von Gefäßveränderungen, wie sie bei Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen auftreten, klassifiziert werden können (Tabib *et al.*, 2000). Als Ursachen der Arteriosklerose bei HIV-1-Infizierten werden sowohl eine endotheliale Dysfunktion als auch die chronische Inflammation infolge der Immunreaktion auf die Virusinfektion diskutiert (Neumann *et al.*, 2002; Zietz *et al.*, 1996).

Durch die Behandlung der HIV-1-Patienten mit der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) stieg deren Lebenserwartung deutlich an (Passalaris *et al.*, 2000). Gleichzeitig wurden bei bis zu 15% der HIV-1-positiven Patienten Schädigungen des Herzens nachgewiesen (Neumann *et al.*, 2002). Als Grund für den Anstieg der kardiovaskulären Komplikationen bei HIV-1-infizierten Patienten werden sowohl die gestiegene Lebenserwartung als auch die Nebenwirkungen der medikamentösen Therapie diskutiert (Acevedo *et al.*, 2002; Barbaro, 2003; Passalaris *et al.*, 2000). Dabei sind alle Bereiche des Herzens einschließlich Endokard (innerste Schicht des Herzens), Myokard (mittlere Schicht), Perikard (äußere Schicht) und die Koronararterien betroffen (Barbaro, 2002; Passalaris *et al.*, 2000). Am häufigsten werden neben arteriosklerotischen Veränderungen der Gefäße, Perikardergüsse, entzündliche Veränderungen des Herzmuskels und der Herzklappen (Myokarditis und Endokarditis) sowie ein Bluthochdruck im Lungenkreislauf (Pulmonale Hypertonie) diagnostiziert (Barbaro, 2003; Passalaris *et al.*, 2000).

Eine Studie amerikanischer Kardiologen weist darauf hin, dass auch HIV-1-infizierte Kinder kardiovaskuläre Auffälligkeiten entwickeln (Lipshultz *et al.*, 1998). Dabei tritt

eine signifikant eingeschränkte Funktion des Herzens auf (höhere Herzfrequenz, geringere Kontraktionsfähigkeit, Vergrößerung der linken Herzkammer), die mit dem Fortschreiten von AIDS stärker korreliert als die CD4<sup>+</sup>-Zellzahl (Lipshultz *et al.*, 1998). Einen Zusammenhang der HIV-1-Infektion mit kardialen Erkrankungen belegt auch die Obduktion von 93 Kindern, die an den Folgen der HIV-1-Infektion verstarben. Bei 11,8% der Kinder war eine chronische Herzerkrankung die Todesursache und bei 51,6% der verstorbenen Kinder konnten Anzeichen einer chronischen, kardialen Erkrankung diagnostiziert werden (Langston *et al.*, 2001). Es ist bekannt, dass die HIV-1-Infektion der Mutter auf das Kind übertragen werden kann (vertikale Transmission). Dies führt häufig zu kardiovaskulären Auffälligkeiten, die bereits kurz nach der Geburt zum Tragen kommen (Langston *et al.*, 2001). Besonders bemerkenswert ist jedoch, dass kürzlich gezeigt wurde, dass Kinder HIV-1-infizierter Mütter auch dann eine signifikant schlechtere Herzfunktion aufweisen, wenn sie selbst nicht infiziert sind (Lipshultz *et al.*, 2002).

## **1.2 Molekulare Mechanismen der Endothelzellaktivierung durch HIV-1**

Inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und Interferon $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) steuern die biologischen Eigenschaften von Endothelzellen. Inflammatorische Zytokine sind eine heterogene Gruppe von Proteinen, die als interzelluläre Mediatoren der Zell/Zell-Kommunikation bei inflammatorischen Prozessen wirken. IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  werden von aktivierten T-Zellen und Monozyten/Makrophagen, IFN $\gamma$  von Lymphozyten synthetisiert und sekretiert (Lafrenie *et al.*, 1997; Sinicco *et al.*, 1993). In der akuten Phase der HIV-1-Infektion werden im Serum und in Zellkulturüberständen hauptsächlich erhöhte IL-1 $\beta$  und IFN $\gamma$  Konzentrationen nachgewiesen (Sinicco *et al.*, 1993), wohingegen TNF $\alpha$  im späteren Krankheitsverlauf vermehrt produziert wird (Breen, 2002; Poli, 1999).

Inflammatorische Zytokine induzieren die Expression von Adhäsionsmolekülen wie *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) und E-Selektin auf Endothelzellen, was zur verstärkten Anlagerung von Leukozyten und Monozyten an das Endothel führt (Pober und Cotran, 1990; Pober *et al.*, 1986; Swerlick *et al.*, 1992). Dies konnte in *in vivo* Untersuchungen an Häutchenpräparationen des Aortenendothels HIV-1-infizierter Patienten bestätigt

werden. Zietz und Mitarbeiter (Zietz *et al.*, 1996) beobachteten, dass HIV-1-Infizierte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine unregelmäßige Struktur der Endothelzellen mit mehrkernigen Zellen und zellfreien Arealen aufweisen (Abb. 1B, Pfeile). Des weiteren konnte bei der Mehrzahl der Patienten eine erhöhte Expression von VCAM-1 und E-Selektin und daraus resultierend eine verstärkte Adhäsion von Leukozyten nachgewiesen werden (Abb. 1C) (Zietz *et al.*, 1996).

Von besonderem Interesse ist die Tatsache, dass in Trophoblastenzellen der Plazenta (Trophoblastenzellen entwickeln sich aus der äußeren Zellschicht der Blastozyste) HIV-1-infizierter Frauen eine erhöhte Expression von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen beobachtet wurde (Moussa *et al.*, 2001; Shearer *et al.*, 1997). Es wird vermutet, dass das Risiko der vertikalen Transmission von HIV-1 eng mit dem physiologischen Zustand der Plazenta zusammenhängt (Moussa *et al.*, 2001).

Auch angiogene Wachstumsfaktoren spielen eine Rolle bei der Ausprägung von AIDS-assoziierten Vaskulopathien. So wurden bei HIV-1-infizierten Patienten erhöhte Serumkonzentrationen von *basic fibroblast growth factor* (bFGF) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) nachgewiesen (Ascherl *et al.*, 1999; Ascherl *et al.*, 2001). Beide Faktoren induzieren synergistisch die Proliferation und Migration von Endothelzellen *in vitro* und *in vivo*, weshalb ihnen auch in der Entwicklung des KS eine wichtige Rolle zugeschrieben wird (Cornali *et al.*, 1996; Esser *et al.*, 1998; Gospodarowicz, 1990; Montesano *et al.*, 1986; Neufeld *et al.*, 1999).

Daneben können virale Faktoren auf das Gefäßsystem wirken. Eines davon ist das HIV-1-Tat-Protein. HIV-1-Tat ist ein kleines regulatives Protein von HIV-1, das von infizierten Zellen über einen spezifischen Sekretionsmechanismus freigesetzt wird (Chang *et al.*, 1997). Zirkulierendes HIV-1-Tat kann von infizierten und nicht-infizierten Zellen aufgenommen werden und die Expression zellulärer Gene beeinflussen (Hofman *et al.*, 1993; Tyagi *et al.*, 2001). In Endothelzellen induziert HIV-1-Tat proinflammatorische und angiogene Aktivität. Es induziert die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin (Dhawan *et al.*, 1997; Hofman *et al.*, 1993) und stimuliert die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen *in vitro* (Lafrenie *et al.*, 1996a). Ebenso induziert es die Proliferation von Endothelzellen, indem es wie VEGF an den Rezeptor VEGFR-2 (kdr/flk-1) bindet und diesen dadurch aktiviert (Albini *et al.*, 1996). Darüber hinaus kann HIV-1-Tat zur Freisetzung von bFGF aus



der extrazellulären Matrix beitragen und dadurch die Endothelzell-Proliferation aktivieren (Barillari *et al.*, 1999).

Ein weiteres Protein von HIV-1, das Oberflächenprotein gp120, kann die biologische Aktivität von Endothelzellen beeinflussen. Es erhöht die Permeabilität des Endothels und induziert die Expression von VCAM-1 und ICAM-1, was zur vermehrten Adhäsion von Leukozyten führt (Toneatto *et al.*, 1999). Außerdem induziert gp120 in niedriger Konzentration in Endothelzellen Apoptose (Ullrich *et al.*, 2000). In Monozyten induziert gp120 die Expression von inflammatorischen Zytokinen, was wiederum zur Aktivierung der Endothelzellen führt (Chi *et al.*, 2000).



**Abb. 1: Häutchenpräparationen zur histologischen Charakterisierung des Aortenendothels von HIV-1-infizierten Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen.**

Zietz und Mitarbeiter beschrieben, dass (A) nicht-infizierte Personen eine regelmäßige Struktur des Aortenendothels aufweisen, dessen Zellen „Pflasterstein“-artig angeordnet sind und isomorphe Zellkerne haben (Zietz *et al.*, 1996). (B) Im Gegensatz dazu ist die regelmäßige Struktur bei HIV-1-infizierten Patienten deutlich gestört. Darüber hinaus können sowohl mehrkernige Zellen beziehungsweise zellfreie Bereiche (schwarze Pfeile) beobachtet werden. (C) In anderen Bereichen des Aortenendothels eines HIV-1-infizierten Patienten können zahlreiche adhärierende mononukleäre Zellen auf dem weitgehend intakten Endothel nachgewiesen werden. Giemsa-Färbung; A: x 120, B: x 180, C: x 180.

### 1.3 Embryonale Vaskulogenese

Die Vaskulogenese, die *in situ* Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen (*endothelial precursor cells*, EPC) aus dem Mesoderm und deren anschließende Organisation in primäre kapillar-ähnliche Strukturen, findet bereits zu Beginn der dritten Schwangerschaftswoche statt (Risau und Flamme, 1995). Dabei aggregieren Zellen des extra-embryonalen Mesoderms und gruppieren sich zu Zellhaufen und

Zellsträngen, den sogenannte Blutinseln (Abb. 2, Vaskulogenese). Die im Zentrum der Blutinseln gelegenen Zellen entwickeln sich zu hämatopoetischen Stammzellen, die peripheren Zellen differenzieren zu Angioblasten, den Vorläuferzellen der Endothelzellen (Abb. 2, Vaskulogenese) (Gonzalez-Crussi, 1971). Durch Wachstum und Fusion der Blutinseln unter gleichzeitiger Endothelzelldifferenzierung bildet sich schließlich ein primitives Netzwerk aus, der sogenannte primäre vaskuläre Plexus (Risau und Flamme, 1995). Dessen Weiterentwicklung führt zur Entstehung großer Blutgefäße, wie zum Beispiel der dorsalen Aorta und dem Aortenbogen (Risau, 1995a). Mit dem Beginn der Blutzirkulation erfolgt die Differenzierung dieses Netzwerks in das arterio-venöse Blutgefäßsystem.

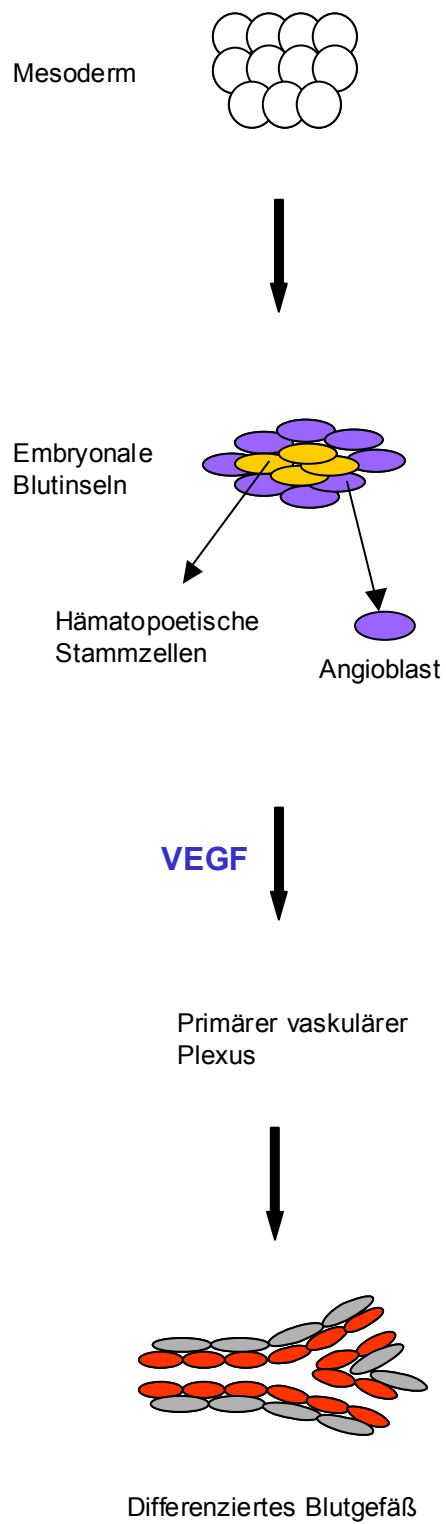
Die enge Assoziation der hämatopoetischen und endothelialen Vorläuferzellen und die Tatsache, dass beide Vorläuferzellarten eine Reihe gemeinsamer Oberflächenantigene exprimieren (VEGFR-2, Tie-2, CD34) gibt Anlass zur Hypothese eines gemeinsamen Vorläufers, des Hämangioblasten (Flamme und Risau, 1992; His, 1900; Weiss und Orkin, 1996).

Die molekularen Mechanismen, die die Vaskulogenese steuern, sind bisher erst teilweise aufgeklärt. Für die Differenzierung von Angioblasten ist der Wachstumsfaktor *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und dessen Rezeptor VEGFR-2 (kdr/flk-1) essentiell (Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996).

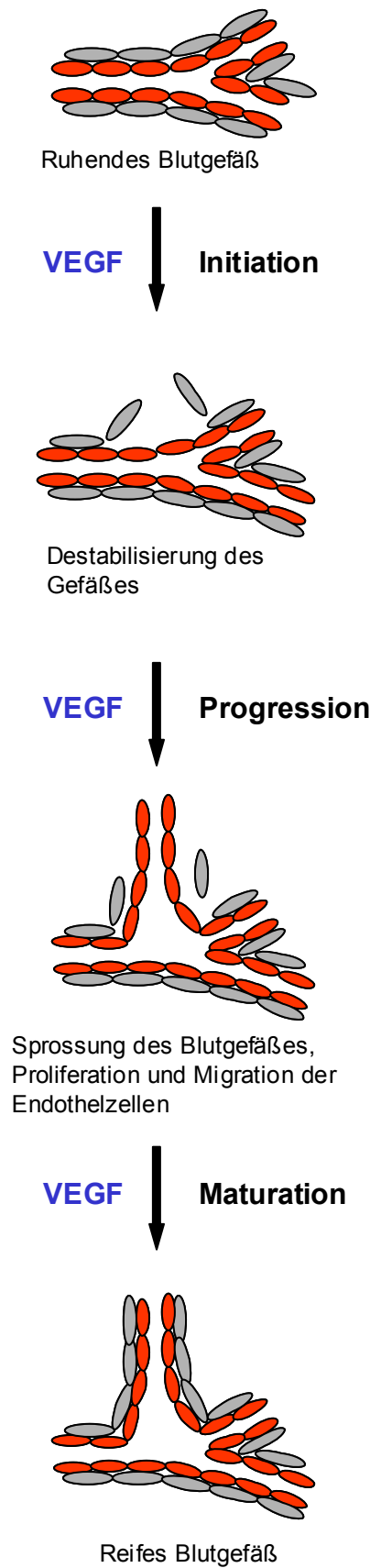
**Abb. 2 (nächste Seite): Bildung von Blutgefäßen durch Vaskulogenese und Angiogenese.**

Die *in situ* Differenzierung von Blutgefäßen im Embryo erfolgt durch Vaskulogenese. Dabei aggregieren Zellen des extra-embryonalen Mesoderms und bilden Blutinseln aus, deren innere Zellen zu hämatopoetischen Stammzellen (gelb) und die peripheren Zellen zu Angioblasten (lila) differenzieren. Unter dem Einfluss von VEGF bildet sich der primäre vaskuläre Plexus aus, der ein einfaches Netz von Endothelzellen darstellt. Die Reifung der Blutgefäße führt zur Ausbildung tubulärer Strukturen, die sich aus der Zusammenlagerung umgebender Zellen wie Perizyten und Glattmuskelzellen (grau) mit den endothelialen Strukturen (rot) entwickeln. Im adulten Organismus kann Angiogenese durch angiogene Wachstumsfaktoren wie VEGF induziert werden. Dabei kommt es zur lokalen Destabilisierung des Gefäßes, dem Ablösen der peri-endothelialen Zellen und dem Abbau der umgebenden Matrix. Durch Proliferation und Migration der Endothelzellen erfolgt das Sprossen des Blutgefäßes, das durch Anlagerung von peri-endothelialen Zellen wieder stabilisiert wird.

## Vaskulogenese



## Angiogenese



## 1.4 Angiogenese

Angiogenese ist die Ausbildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden. Dabei unterscheidet man zwischen der sprossenden und nicht-sprossenden Variante (Carmeliet, 2000a; Risau, 1997). Letztere ist gekennzeichnet durch das Einwachsen von Endothelzellbrücken (Intussuszeption) in das Lumen des Gefäßes, was zur längsseitigen Teilung führt (Risau, 1997).

Unter physiologischen Bedingungen ist das Wachstum des Blutgefäßsystems im adulten Organismus mit Ausnahme des weiblichen Ovarialzyklus und während der Schwangerschaft abgeschlossen (Findlay, 1986; Redmer und Reynolds, 1996). Eine kontrollierte Neubildung von Blutgefäßen tritt bei regenerativen Prozessen wie der Wundheilung, eine unkontrollierte, überschießende bei chronischen Entzündungen (rheumatische Arthritis), Herz-Kreislauf-erkrankungen (Arteriosklerose) und Retinopathien auf (Griffioen und Molema, 2000; Griggs *et al.*, 2002; Weber und De Bandt, 2000). Vor allem aber in der Tumorentwicklung spielt die Angiogenese eine wichtige Rolle, da ohne die Versorgung mit Blutgefäßen das Wachstum von Tumoren auf 1-2 Millimeter begrenzt ist (Carmeliet und Jain, 2000b; Folkman, 1995).

Grundsätzlich verläuft die Angiogenese in mehreren Einzelschritten, die in Initiation, Progression und Maturation unterteilt wird (Abb. 2, Angiogenese) (Carmeliet und Jain, 2000b). Bei der Initiation werden die Endothelzellen durch Wachstumsfaktoren aktiviert und die Basalmembran durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) degradiert (Abb. 2, Angiogenese). Während der Progression migrieren und proliferieren die Endothelzellen und bilden neue Kapillaren aus. Danach folgt die Maturation, bei der die Basalmembran rekonstituiert wird und sich je nach Gefäßtyp Perizyten oder Glattmuskelzellen zur Stabilisierung des Gefäßes anlagern (Abb. 2, Angiogenese) (Distler *et al.*, 2002; Griffioen und Molema, 2000; Nelson *et al.*, 2000). Sowohl das Endothel als auch die umgebenden Zellen sezernieren Faktoren, die zum Aufbau neuer extrazellulärer Matrix und zum Ruhezustand (Quieszenz) des neugebildeten Gefäßes beitragen (Griffioen und Molema, 2000).

Der Aufbau größerer Blutgefäße erfolgt nach einem gemeinsamen Grundbauplan. Die innerste Schicht, die Tunica intima, besteht aus Endothelzellen, die von der Basalmembran umgeben ist. Daran schließt die Tunica media an, die abhängig vom Gefäßtyp, glatte Muskulatur oder elastische Fasern enthält. Bei den Arterien ist die Media die am kräftigsten entwickelte Wandschicht. Nach außen begrenzt die Tunica

adventitia das Gefäß, die aus Bindegewebe aufgebaut ist und mit dem umgebenden Gewebe in Verbindung steht (Carmeliet, 2000c; Griffioen und Molema, 2000).

Kapillaren sind im Gegensatz zu größeren Gefäßen weniger komplex aufgebaut. Sie bestehen aus Endothelzellen und Basalmembran (Griffioen und Molema, 2000). Abhängig vom Gefäßtyp können Perizyten angelagert sein oder fehlen (Griffioen und Molema, 2000). Man unterscheidet Kapillaren mit nicht fenestriertem, fenestriertem und diskontinuierlichem Endothel (siehe Kapitel 1.7 Heterogenität des Endothels).

## 1.5 Regulatoren der Angiogenese

Unter normalen physiologischen Bedingungen befindet sich das Endothel in einem quieszenten Zustand, der durch die Balance von pro- und anti-angiogenen Faktoren aufrechterhalten wird (Bussolino *et al.*, 1997; Distler *et al.*, 2002). Zu den wichtigsten Wachstumsfaktoren für Endothelzellen gehört die Familie der VEGF, die aus sechs strukturell ähnlichen Wachstumsfaktoren besteht: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und *placenta growth factor* (PlGF) (Betsholtz *et al.*, 1986; Joukov *et al.*, 1997; Keck *et al.*, 1989; Maglione *et al.*, 1991; Meyer *et al.*, 1999; Ogawa *et al.*, 1998; Olofsson *et al.*, 1998; Orlandini *et al.*, 1996). VEGF induziert die Proliferation, fördert die Migration und verhindert die Apoptose von Endothelzellen (Gerber *et al.*, 1998). *In vivo* induziert es neben der Angiogenese auch die Permeabilisierung der Gefäße (Neufeld *et al.*, 1999). Eine deregulierte VEGF-Expression wird sowohl in Tumoren als auch in Krankheiten, die mit erhöhter Angiogenese einhergehen, beobachtet (Aiello *et al.*, 1994; Carmeliet und Jain, 2000b; Desai und Libutti, 1999; Folkman, 1995). Dies könnte auch im Zusammenhang mit der HIV-1-Infektion eine Rolle spielen, da wie bereits erwähnt bei HIV-1-Infizierten eine erhöhte VEGF-Serumkonzentrationen nachgewiesen wurde (Ascherl *et al.*, 1999) und ein dadurch erhöhtes KS-Risiko (Ascherl *et al.*, 1999; Ensoli *et al.*, 2001; Hengge *et al.*, 2002a). Endothelzellen exprimieren die Rezeptor-Tyrosinkinasen VEGFR-1 (flt-1) und VEGFR-2 (kdr/flk-1) (Neufeld *et al.*, 1999).

Neben VEGF induziert auch bFGF die Proliferation von Endothelzellen (Okada-Ban *et al.*, 2000). bFGF gehört zur Gruppe der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren (Gospodarowicz, 1990). Auch bFGF ist im Serum von HIV-infizierten Patienten erhöht und korreliert signifikant mit einer schlechteren Prognose (Ascherl *et al.*,

2001). So konnte gezeigt werden, dass extrazelluläres bFGF, das an Heparansulfat-Proteoglykane der extrazellulären Matrix gebunden ist, von HIV-1-Tat freigesetzt wird und als Konsequenz den angiogenen Effekt von bFGF auf Endothelzellen verstärkt (Barillari *et al.*, 1999). Das wiederum steigert das Risiko für AIDS-KS (Ensoli *et al.*, 2001). Allerdings ist bFGF weniger spezifisch für Endothelzellen, da es auch auf Glattmuskelzellen, Fibroblasten, mesodermale und neuroektodermale Zellen wirkt (Bikfalvi *et al.*, 1997). Die Wirkung von bFGF wird durch die Rezeptoren FGFR-1 bis -4 (Rezeptor-Tyrosinkinasen) vermittelt (Suhardja und Hoffman, 2003).

Auch Matrix-Metalloproteasen (MMPs) haben eine wichtige Rolle in der Vaskulogenese und Angiogenese. MMPs bilden eine große Familie von zinkabhängigen Enzymen, mit derzeit mehr als 20 verschiedenen Mitgliedern, die aufgrund ihrer Struktur und Substratspezifität in vier Hauptgruppen unterteilt werden: interstitielle Kollagenasen (MMP-1), Gelatinasen (MMP-2), Stromelysine und *membrane-type MMPs* (MT1-MMP) (Egeblad und Werb, 2002; Nagase und Woessner, 1999). Die Aktivität der MMPs wird sowohl auf der Ebene der Transkription kontrolliert, als auch über die Aktivierung des latenten Proenzym und durch Komplexbildung mit spezifischen Inhibitoren, sogenannte *Tissue Inhibitors of Metallo-Proteinases* (TIMPs) (Creemers *et al.*, 2001). Die Expression von MMPs wird durch Stimulation mit angiogenen Wachstumsfaktoren, inflammatorischen Zytokinen, Kortikosteroiden, Neurohormonen oder Chemokinen induziert (Crawford und Matrisian, 1996; Mauviel, 1993).

Bei vielen Krankheitsbildern einschließlich Arteriosklerose, Retinopathien, Tumorprogression und insbesondere kardiovaskulären Erkrankungen ist die Aktivität verschiedener MMPs deutlich erhöht (Brinckerhoff *et al.*, 2000; Creemers *et al.*, 2001; Kosano *et al.*, 1999; Pasterkamp *et al.*, 2000; Spinale *et al.*, 2000).

## **1.6 Postnatale Vaskulogenese und endotheliale Vorläuferzellen**

Das Dogma, dass endotheliale Vorläuferzellen (*Endothelial Precursor Cells*, EPC) nur während der Embryogenese existieren, ist seit einigen Jahren widerlegt. Asahara und Mitarbeiter wiesen auch im Blut Erwachsener Zellen nach, die antigene Determinanten von Angioblasten und hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimieren und die sich *in vitro* zu Endothelzellen differenzierten (Asahara *et al.*, 1997).

Shi und Mitarbeiter zeigten im Tiermodell mit Hunden, dass zirkulierende EPC aus dem Knochenmark an der Reendothelialisierung von Gefäßprothesen beteiligt sind (Shi *et al.*, 1998). Hierzu zerstörten sie das hämatopoetische System der Versuchstiere durch Bestrahlung und rekonstituierten es durch Transplantation von fremdem Knochenmark. Danach ersetzten sie einen Teil der Aorta durch ein Implantat. Damit keine Endothelzellen von den angrenzenden Arealen einwachsen konnten, behandelten sie das Implantat mit Silikon. 12 Wochen nach dem Einsetzen der Gefäßprothese war diese mit Endothelzellen bedeckt, die den Genotyp des Knochenmarkspenders aufwiesen.

Asahara und Mitarbeiter (Asahara *et al.*, 1999a) führten diese Versuche weiter, indem sie bestrahlten Mäusen das Knochenmark transgener Tiere transplantierten, deren Zellen das Gen  $\beta$ -Galaktose (LacZ) unter der Kontrolle Endothelzell-spezifischer Promotoren exprimierten. Anhand der Expression von LacZ konnten die transplantierten Zellen im Empfängertier identifiziert werden. Sie waren vorwiegend im Knochenmark, im peripheren Blut und in Arealen aktiver Angiogenese wie im Corpus luteum des Ovars, in wachsenden Tumoren und in ischämischen Regionen nach Infarkten lokalisiert.

Diese Versuche belegen, dass zirkulierende EPC aus dem Knochenmark freigesetzt werden, in Bereiche aktiver Angiogenese einwandern und außerdem an der Reendothelialisierung von Gefäßprothesen beteiligt sind.

Die Freisetzung und Differenzierung von EPC aus dem Knochenmark ist ein komplexer Prozeß, der durch eine Reihe von Faktoren wie VEGF, Plazenta Wachstumsfaktor, Angiopoetin-1, MMP-9 und andere Faktoren beeinflusst wird (Hattori *et al.*, 2002; Heissig *et al.*, 2002; Luttun *et al.*, 2002; Lyden *et al.*, 2001). Ektopische VEGF-Expression induzierte bei Mäusen eine vermehrte Mobilisierung zirkulierender EPC aus dem Knochenmark (Asahara *et al.*, 1999; Kalka *et al.*, 2000). Klinische Studien zeigten, dass Patienten nach Herzinfarkten und koronaren Bypassoperationen ebenso wie Verbrennungsoffer innerhalb weniger Stunden (Std.) nach dem Vorfall erhöhte VEGF-Serumkonzentrationen aufweisen und nachfolgend vermehrt EPC im peripheren Blut zirkulieren (Gill *et al.*, 2001; Shintani *et al.*, 2001). Im Zusammenhang mit HIV-1 liegen derzeit keine Kenntnisse vor, ob die erhöhten VEGF-Serumkonzentrationen zu einer vermehrten Freisetzung von EPC aus dem Knochenmark führen.

Obwohl es zweifelsfrei gelang nachzuweisen, dass EPC an der Neovaskularisierung beteiligt sind, ist nicht bekannt, ob EPC sich an Stellen, an denen Gefäßsprossung stattfindet, einnisten oder ob Blutgefäße von EPC *de novo* gebildet werden. Des weiteren ist ungeklärt, wie EPC an die Stellen, an denen Gefäßneubildung stattfindet, dirigiert werden.

## 1.7 Heterogenität des Endothels

In seiner Gesamtheit bildet das Endothel ein disseminiertes systemisches Organ, das entsprechend seiner spezifischen Funktion heterogen ausgebildet ist (Risau und Flamme, 1995)

Das Endothel großer Blutgefäße unterscheidet sich von mikrovaskulärem Endothel in vielen Aspekten. Beispielsweise sind makrovaskuläre Endothelzellen nicht in die Prozesse der Neoangiogenese involviert (Risau, 1995a). Weitere Unterscheidungskriterien sind die Zellgröße und -form, die Orientierung in Bezug auf die Blutstromrichtung, die Komplexität der interzellulären Verbindungen sowie der umgebenden Gefäßwand (Thorin und Shreeve, 1998). Generell sind Endothelzellen kleiner Gefäße flach und abhängig von der Funktion kontinuierlich oder diskontinuierlich (mit Fenestrierung), wohingegen Endothelzellen großer Gefäße polygonal, größer und ohne Fenestrierung wachsen (Cleaver und Melton, 2003). Am deutlichsten ist die Heterogenität des Endothels von Kapillaren auf morphologischer Ebene zu sehen. Endothel das vorwiegend den Blutstrom begrenzt und als Barriere fungiert (Blut-Hirn-Schranke) ist kontinuierlich ausgebildet (Carmeliet und Jain, 2000b; Risau, 1995a). In diesen Kapillaren liegen die Endothelzellen lückenlos nebeneinander, wobei sich ihre Zellränder überlappen (Risau, 1995a). Im Gegensatz dazu findet man fenestriertes und diskontinuierliches Endothel in Kapillaren, in denen der Stoffaustausch im Vordergrund steht wie in der Niere, der Lunge und in endokrinen Drüsen (Carmeliet und Jain, 2000b). Bei fenestriertem Endothel kleiden die Endothelzellen die Kapillare lückenlos aus, wobei die einzelne Endothelzelle intrazelluläre Poren enthält, die durch eine dünne Scheidewand verschlossen sind (Risau, 1995a). Außen liegt die Basalmembran an. Im Gegensatz dazu ist das diskontinuierliche Endothel durch Lücken zwischen den Endothelzellen und einer unterbrochenen Basalmembran charakterisiert (Risau, 1995a). Auch im



Wachstumsverhalten unterscheiden sich makro- und mikrovaskuläre Endothelzellen deutlich. In Kultur verdoppeln sich makrovaskuläre Endothelzellen aus der humanen umbilikalen Vene oder Arterie (HUVEC, HUAEC) binnen 33 bis 35 Std., wohingegen mikrovaskuläre Endothelzellen 63 bis 83 Std. benötigen (Beekhuizen und van Furth, 1994).

Ein spezieller Typ des makrovaskulären Endothels ist das Endokard, das die Innenräume des Herzens auskleidet und die Herzklappen überzieht. Dieses Endothel ist von einer dünnen subendothelialen Schicht aus lockerem Bindegewebe umgeben (Risau, 1995a). Wahrscheinlich ist es das erste Endothelgewebe, das während der Embryonalentwicklung vom axialen Mesoderm gebildet wird (Risau, 1995a).

Eine weitere Endothelzellpopulation sind EPC. Wie bereits erwähnt, können sie aus hämatopoetischem Gewebe des Knochenmarks und der fötalen Leber, als zirkulierende Zellen aus dem peripheren Blut Erwachsener sowie aus Nabelschnurblut Neugeborener isoliert werden (Murohara *et al.*, 2000; Peichev *et al.*, 2000). Sowohl hämatopoetische Stammzellen als auch EPC exprimieren die Oberflächenmoleküle VEGFR-2, das Glykoprotein CD34 sowie CD133 (Gehling *et al.*, 2000; Peichev *et al.*, 2000; Ziegler *et al.*, 1999). CD133 (früher AC133) ist ein früher Stammzellmarker, der von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert wird, die vorwiegend noch im Knochenmark lokalisiert sind (Quirici *et al.*, 2001; Yin *et al.*, 1997). EPC sind durch den Marker CD133 charakterisiert und exprimieren konstitutiv die Endothelzell-spezifischen Marker CD31, VE-Cadherin und von Willebrand Faktor (vWF, siehe Kaptiel 1.8.1 und 1.8.2 konstitutive und induzierbare Endothelzellmarker). Im Rahmen der Differenzierung verlieren sie den Stammzellmarker CD133 (Asahara *et al.*, 1997; Gehling *et al.*, 2000). Bisher ist jedoch unklar, wann und wie sich EPC *in vivo* zu reifen Endothelzellen entwickeln. Die Anzahl der zirkulierenden EPC im Blut Gesunder variiert laut Literaturangaben zwischen 70 (Peichev *et al.*, 2000) bis 5000 (Kalka *et al.*, 2000a) pro ml Blut. Dabei wurden die EPC allerdings nach unterschiedlichen Kriterien definiert. Kalka und Mitarbeiter identifizieren EPC anhand der Doppelfärbung mit *Ulex europaeus*-Lektin und der Aufnahme von acetyliertem *Low Density Lipoprotein* (Ac-LDL) (Kalka *et al.*, 2000a). Peichev und Mitarbeiter verwenden als Nachweis von EPC die Oberflächenantigene CD34, VEGFR-2 und CD133 (Peichev *et al.*, 2000).

Neben dem Blutgefäßsystem existiert noch das lymphatische Gefäßsystem. Es beginnt an blind endenden Kapillaren und endet herznah in der unteren Hohlvene, also im venösen Blutkreislauf. Es transportiert interstitielle Flüssigkeit, Makromoleküle und Immunzellen aus dem Gewebe sowie Fett aus dem Verdauungstrakt in die Blutbahn (Lohela *et al.*, 2003; Rafii und Skobe, 2003). Im Gegensatz zum Endothel der Blutgefäße sind lymphatische Kapillaren nicht von Perizyten umgeben und besitzen keine oder nur eine inkomplette Basalmembran (Sleeman *et al.*, 2001). Größere Lymphgefäße sind von Glattmuskelzellen umgeben (Sleeman *et al.*, 2001). Lymphatische Endothelzellen zeigen eine iso- bis hochprismatische Morphologie. Charakteristische Marker sind Podoplanin, VEGFR-3 sowie *Lymphatic Vessel Endothelial HA receptor-1* (LYVE-1) (Banerji *et al.*, 1999; Partanen und Paavonen, 2001).

In dieser Arbeit wurde mit humanen makrovaskulären Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) und -arterie (HUAEC), humanen mikrovaskulären Endothelzellen der Haut (HMVEC) und mit EPC gearbeitet.

### **1.8 Charakteristische Endothelzellmarker zur Klassifizierung von quieszentem und aktiviertem Endothel**

Endothelzellen exprimieren eine Reihe spezifischer Marker, die zur Charakterisierung der Zellen *in vivo* und *in vitro* dienen. Da kein Marker bekannt ist, der ausschließlich von Endothelzellen exprimiert wird, erfolgt die Klassifizierung meist anhand mehrerer Antigene.

Wenn keine stimulierenden Einflüsse auf das Endothel einwirken, ist die Proliferationsrate der Endothelzellen niedrig und die Adhäsionskompetenz für Leukozyten gering (quieszentes Epithel). Unter dem Einfluss von angiogenen Wachstumsfaktoren, inflammatorischen Zytokinen oder Chemokinen exprimieren Endothelzellen spezifische Gene, die nachfolgend die Proliferation der Endothelzellen oder die Expression von Adhäsionsmolekülen und Rezeptoren induzieren (aktiviertes Endothel). Abhängig vom jeweiligen Zustand exprimieren Endothelzellen eine Reihe unterschiedlicher Marker, die zur Charakterisierung verwendet werden können. Dabei wird zwischen konstitutiv exprimierten und

induzierbaren Markern unterschieden, wobei die Letzteren nur in aktivierten Endothelzellen exprimiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die konstitutiv exprimierten Marker CD31, CD34, CD105 und der *Scavenger* Rezeptor I untersucht. Aus der Gruppe der durch inflammatorische Zytokine induzierbaren Marker wurde ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin sowie die Reduzierung von vWF nach Behandlung der Zellen mit inflammatorischen Zytokinen nachgewiesen.

### **1.8.1 Konstitutiv exprimierte Endothelzellmarker**

CD31 (PECAM-1), ist ein 130 kDa transmembranes Glykoprotein aus der Immunglobulin-(Ig)-Superfamilie (Williams und Barclay, 1988). CD31 wird von Endothelzellen stark und in einem geringeren Umfang von Monozyten, neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten und einer Untergruppe der T-Zellen exprimiert (Watt *et al.*, 1995). CD31 ist besonders an den Kontaktstellen benachbarter Endothelzellen lokalisiert (Newman, 1994). Es spielt eine wichtige Rolle bei der homophilen Interaktion zwischen Endothelzellen und bei der heterophilen Interaktion zwischen Endothelzellen und Leukozyten (Nakada *et al.*, 2000). Einen Überblick über die aufgelisteten Endothelzellmarker gibt Tabelle 1.1.

CD34 ist ein 115 kDa transmembranes Glykoprotein, das von Endothelzellen, hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen und einigen Leukämiezellen exprimiert wird (Fina *et al.*, 1990; Krause *et al.*, 1996; Krause *et al.*, 1994). *In vivo* ist CD34 mit Endothelzellen kleiner Blutgefäße assoziiert, große Blutgefäße und Endothelzellen in Kultur sind negativ für dieses Oberflächenantigen (Delia *et al.*, 1993). Obwohl CD34 keine Funktion zugeordnet werden konnte, dient es als Marker zur Diagnostik und Typisierung von Leukämien. Darüber hinaus wird es zur Selektion hämatopoetischer Vorläuferzellen aus dem Blut verwendet, die alternativ zur Knochenmarkstransplantation zur Behandlung hämatologischer und onkologischer Erkrankungen eingesetzt werden (Link und Arseniev, 1997; Sutherland, 1996). Wie bereits erwähnt dient CD34 auch zur Isolierung von EPC aus dem zirkulierenden Blut und hämatopoetischem Gewebe (siehe Kapitel 1.6 Postnatale Vaskulogenese und EPC). CD34 ist zur Lokalisierung und Adhäsion von Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark wichtig (Sutherland und Keating, 1992) und könnte auch an der

Stabilisierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen beteiligt sein (Fackler *et al.*, 1995).

CD105 (Endoglin), ist ein 180 kDa homodimeres Glykoprotein, das *in vitro* von proliferierenden Endothelzellen und *in vivo* von Arterien, Venen und Kapillaren exprimiert wird (Duff *et al.*, 2003; Gougos und Letarte, 1988). Insbesondere Blutgefäße wachsender Tumoren sind stark positiv für CD105 (Burrows *et al.*, 1995; Duff *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2001). CD105 wird auch von Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten und von einem Teil der hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks exprimiert (Garlanda und Dejana, 1997; Rokhlin *et al.*, 1995). CD105 fungiert als akzessorischer Rezeptor für einige Mitglieder der *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$  Superfamilie (Barbara *et al.*, 1999).

Scavenger Rezeptor I ist ein 115 kDa glykosyliertes Transmembranprotein, das neben Endothelzellen auch von Makrophagen, Monozyten, Glattmuskelzellen, Perizyten und Fibroblasten exprimiert wird (Garlanda und Dejana, 1997; Goldstein *et al.*, 1979; Voyta *et al.*, 1984). Scavenger Rezeptor I vermittelt die Aufnahme von acetyliertem Lipoprotein geringer Dichte (*Low Density* Lipoprotein, Ac-LDL), das eine modifizierte Form von LDL ist. LDL fungiert als Transportprotein für Cholesterin. Die Aufnahme von Ac-LDL wird häufig zur Charakterisierung von isolierten EPC eingesetzt (Asahara *et al.*, 1997; Kalka *et al.*, 2000a; Vasa *et al.*, 2001).

**Tabelle 1.1: Charakteristische Endothelzellmarker.**

Marker	Expression	Funktion	Literatur
<b>Konstitutiv exprimierte Marker</b>			
CD31 (PECAM-1)	Endothelzellen, Monozyten, Neutrophile Granulozyten, Thrombozyten, Fraktion der T-Zellen	Homophile Interaktion von Endothelzellen Heterophile Interaktion von Endothelzellen mit Leukozyten	(Nakada <i>et al.</i> , 2000; Scholz und Schaper, 1997)
CD34	Endothelzellen kleiner Gefäße <i>in vivo</i> , hämatopoetischen Stamm-	Keine Funktion bekannt, diagnostischer Marker	(Delia <i>et al.</i> , 1993; Fina <i>et al.</i> , 1990; Krause <i>et al.</i> ,

	und Vorläuferzellen, kleine Fraktion von Leukämiezellen	für Typisierung von Leukämien	1996; Krause <i>et al.</i> , 1994; Link und Arseniev, 1997; Sutherland, 1996)
CD105 (Endoglin)	Endothelzellen <i>in vitro</i> , Blutgefäße <i>in vivo</i> , insbesondere in Tumoren, Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, kleine Fraktion der hämatopoetischen Vorläuferzellen,	akzessorischer Rezeptor für TGF- $\beta$ Familie	(Burrows <i>et al.</i> , 1995; Duff <i>et al.</i> , 2003; Garlanda und Dejana, 1997; Gougos und Letarte, 1988; Rokhlin <i>et al.</i> , 1995)
Scavenger Rezeptor I	Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen, Glattmuskelzellen, Fibroblasten	Aufnahme von acetyliertem Low Density Lipoprotein (Ac-LDL)	(Garlanda und Dejana, 1997; Goldstein <i>et al.</i> , 1979; Voyta <i>et al.</i> , 1984)

#### Induzierbare Marker

von Willebrand Factor (vWF)	Endothelzellen, Thrombozyten, Megakaryozyten	Verhindert den Abbau von Faktor VIII, vermittelt die Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel	(Sadler, 1991)
E-Selektin (CD62e)	Endothelzellen	Vermittelt das „Rollen“ von Leukozyten auf dem Endothel	(Bochner <i>et al.</i> , 1991; Carlos <i>et al.</i> , 1991; Pober <i>et al.</i> , 1986)
<i>Intercellular adhesion molecule</i> (ICAM-1, CD54)	Endothelzellen, Lymphozyten, Monozyten	Vermittelt die Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel	(Fisher <i>et al.</i> , 1997; Pober <i>et al.</i> , 1986; Rothlein <i>et al.</i> , 1986)

<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i> (VCAM-1, CD106)	Endothelzellen, Glattmuskelzellen, Fibroblasten, Melanomzellen	Vermittelt die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel	(Ardehali <i>et al.</i> , 1995; Langley <i>et al.</i> , 2001; Meng <i>et al.</i> , 1995; Swerlick <i>et al.</i> , 1992; Verdegaal <i>et al.</i> , 1993)
--	---	---	--

### 1.8.2 Induzierbare Endothelzellmarker

Die Aktivierung des Endothels erfolgt als Antwort auf verschiedene Stimuli wie inflammatorische Zytokine und angiogene Wachstumsfaktoren. In entzündlichen Prozessen induzieren inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  die Expression von Adhäsionsmolekülen, welche die Adhäsion von Monozyten und Lymphozyten an das Endothel regulieren und dadurch das Auswandern dieser Zellen aus dem Blutgefäß in das Gewebe ermöglichen.

E-Selektin ist ein 130 kDa Kohlenhydrat-bindendes Glykoprotein, das ausschließlich von Endothelzellen exprimiert wird (Bevilacqua *et al.*, 1989). Die Expression von E-Selektin wird durch die inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  induziert (Pober *et al.*, 1986). E-Selektin vermittelt das „Rollen“ von Granulozyten, Monozyten und T-Lymphozyten auf dem Endothel, ohne dass diese fest am Endothel anhaften (Bochner *et al.*, 1991; Carlos *et al.*, 1991).

*Intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1, 100 kDa) gehört zur Familie der Ig-Superfamilie (Williams und Barclay, 1988). ICAM-1 bindet die  $\beta$ 2-Integrine (LFA-1, MAC-1 und p150/95) auf der Oberfläche von Leukozyten (Fisher *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1989). ICAM-1 wird in geringem Umfang konstitutiv von Endothelzellen, einigen Lymphozyten und Monozyten exprimiert (Rothlein *et al.*, 1986). Durch Stimulation mit inflammatorischen Zytokinen wird die Expression von ICAM-1 in Endothelzellen und in einer Reihe anderer Zellen verstärkt (Pober *et al.*, 1986). Ferner sind Melanomzellen stark positiv für ICAM-1 (Haritopoulos *et al.*, 2003).

*Vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1, ein 110 kDa) gehört ebenfalls zur Ig-Superfamile (Williams und Barclay, 1988). Nach Stimulation mit inflammatorischen Zytokinen wird VCAM-1 im Endothel kleiner und großer Blutgefäße induziert (Swerlick *et al.*, 1992) und vermittelt die Adhäsion von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten (Verdegaal *et al.*, 1993; Weller *et al.*, 1991). VCAM-1 wird auch von anderen Zellen wie Glattmuskelzellen, Fibroblasten und Melanomzellen exprimiert (Ardehali *et al.*, 1995; Langley *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 1995).

vWF ist ein großes multimeres Glykoprotein, das ausschließlich von Endothelzellen, Thrombozyten und Megakaryozyten synthetisiert wird. Endothelzellen speichern vWF in Weibel-Palade-Körperchen; Thrombozyten und Megakaryozyten in  $\alpha$ -Granulae (Mannucci, 1995). Die Sekretion des vWF ins Plasma erfolgt vorwiegend durch Endothelzellen. Dies geschieht als konstitutiv, langsam ablaufender Prozess oder schnell, nach Induktion durch verschiedene Mediatoren der Blutgerinnung oder durch inflammatorische Zytokine (Wagner, 1990). Ins Plasma freigesetzt bildet vWF mit dem Gerinnungsfaktor VIII einen Komplex aus und verhindert damit dessen Abbau (Sadler, 1991). Außerdem vermittelt vWF die Adhäsion von Thrombozyten an das aktivierte Endothel (Sadler, 1991).

## **1.9 Das humane Guanylat-Bindungsprotein-1**

Neben Adhäsionsmolekülen induzieren die inflammatorischen Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  in Endothelzellen auch eine erhöhte Expression des Guanylat-Bindungsproteins-1 (GBP-1) *in vitro* und *in vivo* (Guenzi *et al.*, 2001; Lubeseder-Martellato *et al.*, 2002). Ursprünglich wurde GBP-1 als ein Interferon-induzierbares Protein in Fibroblasten beschrieben (Cheng *et al.*, 1983). In unserem Labor konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von GBP-1 in mikro- und makrovaskulären Endothelzellen durch inflammatorische Zytokine induziert und durch angiogene Wachstumsfaktoren wie VEGF und bFGF gehemmt wird (Cornali *et al.*, 1996; Guenzi *et al.*, 2001). Darüber hinaus belegten histologische Schnitte von inflammatorischen Hauterkrankungen, dass GBP-1 *in vivo* ausschließlich von inflammatorischen Zytokin-aktivierten Endothelzellen exprimiert wird (Guenzi *et al.*, 2001; Lubeseder-Martellato *et al.*, 2002). So konnte GBP-1 in Blutgefäßen von Patienten mit Psoriasis und KS, jedoch nicht bei Gesunden nachgewiesen werden.

Inflammatorische Zytokine hemmen die Proliferation von Endothelzellen. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass GBP-1 die anti-proliferative Wirkung von inflammatorischen Zytokinen auf Endothelzellen vermittelt (Guenzi *et al.*, 2001).

Aufgrund seiner Molekularstruktur und der biochemischen Eigenschaften gehört GBP-1 zur Gruppe der großen GTPasen wie Dynamin und Mx-Protein, deren gemeinsame Merkmale die Fähigkeit zu oligomerisieren und eine konzentrationsabhängige GTPase-Aktivität sind (Prakash *et al.*, 2000).



## 2 Fragestellung und Zielsetzung

Zu den Folgen einer HIV-1-Infektion gehören neben der am häufigsten beschriebenen Immunschwäche auch Gefäßveränderungen und kardiovaskuläre Erkrankungen (Barbaro, 2002; Chi *et al.*, 2000; Passalaris *et al.*, 2000). Nicht nur infizierte Personen zeigen Veränderungen des Herz-Kreislaufsystems, sondern auch nicht-infizierte Kinder von HIV-1-positiven Müttern (Lipshultz *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit sollte an makrovaskulären Endothelzellen aus der Nabelschnurvene und -arterie (HUVEC, HUAEC) von nicht-infizierten Kindern HIV-1-infizierter und nicht-infizierter Mütter untersucht werden, ob sich die maternale HIV-1-Infektion auch auf die Endothelzellen des Neugeborenen auswirkt. Zur Klärung der Frage, ob etwaige Veränderungen auch in EPC manifestiert sind, sollten undifferenzierte, multipotente EPC der CD34<sup>+</sup>-Fraktion des Nabelschnurblutes in die Untersuchungen einbezogen werden. Die Entwicklung der Nabelschnur erfolgt aus embryonalem Gewebe und repräsentiert wie das Nabelschnurblut die kindliche Seite (Drews, 1993; Rohen, 1988).

Zunächst sollte die Kultivierung der CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Zellfraktion etabliert und die isolierten EPC *in vitro* expandiert werden. Die nachfolgenden Versuche sollten dann mit EPC-Langzeitkulturen durchgeführt werden. Die isolierten HUVEC, HUAEC und EPC-Langzeitkulturen von Kindern HIV-1-infizierter Mütter (HIV-1-Gruppe) und nicht-infizierter Mütter (N-Gruppe) sollten mittels Endothelzell-spezifischer Marker charakterisiert und hinsichtlich morphologischer und funktioneller Unterschiede verglichen werden. Darüber hinaus sollte das Gen-Expressionsprofil anhand eines cDNA-Makroarrays verglichen werden. Differentiell exprimierte Gene sollten auf RNA- und Proteinebene bestätigt werden und bezüglich ihrer Funktion in der Ausbildung von Gefäßdefekten bei nicht-infizierten Kindern HIV-1-inizierter Mütter untersucht werden.

### **3 Ergebnisse**

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die HIV-1-Infektion der Mutter auf die kindlichen Endothelzellen Einfluss nimmt. Dabei war von besonderem Interesse, ob diese Veränderungen bereits in den EPC manifestiert sind oder erst nachfolgend in differenzierten Endothelzellen des Gewebeverbandes auftreten.

#### **3.1 Isolierung von humanen Endothelzellen**

##### **3.1.1 Etablierung der Isolierung und Kultivierung von CD34-positiven endothelialen Vorläufer-Zellen (EPC) aus Nabelschnurblut**

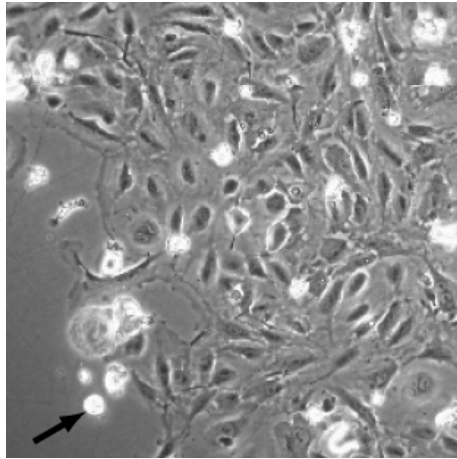
EPCs sollten aus dem Nabelschnurblut isoliert werden. Aufgrund der geringen Mengen des Ausgangsmaterials (4 bis 15 ml) mussten die CD34<sup>+</sup>-Zellen nach der Isolation vermehrt werden. Da die beschriebenen Kulturbedingungen zur *ex vivo* Vermehrung von EPC sehr große Unterschiede aufweisen (Gehling *et al.*, 2000; Murohara *et al.*, 2000; Vasa *et al.*, 2001), wurden zunächst die optimalen Bedingungen zur Kultivierung der EPC ermittelt.

Zur Etablierung dieser Methode wurden Blutproben gesunder Probanden und Nabelschnurblut von Kindern HIV-1-negativer Mütter verwendet. Um die Gerinnung des Blutes zu verhindern, wurde es entweder mit Heparin oder EDTA versetzt. Danach wurden die mononukleären Zellen mittels Ficollgradient isoliert und anschließend wurden die hämatopoetischen Vorläuferzellen mit Hilfe von Antikörpern gegen CD34, die mit Magnetpartikeln konjugiert sind, aus dieser Zellfraktion gewonnen und unter verschiedenen Kulturbedingungen ausgebracht (Abb. 20, Material & Methoden). Es wurden folgende Parameter zur Kultivierung der EPC getestet: Endothelzell-spezifische Medien (EBM und IMDM), die Zugabe von fötalem Kalbserum (FKS) in unterschiedlichen Konzentrationen (5%, 10%, 20%), die Zugabe von Pferdeserum (PS, 10%) in Kombination mit FKS, Stimulierung des Wachstums der EPC mit den angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF (50 ng/ml) und bFGF (20 ng/ml) sowie dem Stammzell-Wachstumsfaktor (20 ng/ml) und die Beschichtung der Kulturgefäße mit Gelatine oder Fibronectin.

Bei Kultivierung der isolierten Zellen in IMDM mit FKS (5% und 20%) und der Zugabe von VEGF, bFGF wurden keine Endothelzellen erhalten. Bei Kultivierung in IMDM mit 10% FKS, 10% PS, VEGF, bFGF und Stammzell-Wachstumsfaktor wuchsen

nach acht Tagen kleine Zellhaufen, wobei diese Zellen nur sehr langsam proliferierten. Die besten Ergebnisse wurden bei der Kultivierung in EBM mit 10% FKS, 10% PS und 50 ng/ml Stammzell-Wachstumsfaktor und bei einer Beschichtung der Kulturgefäße mit Fibronectin erzielt. Unter diesen Bedingungen konnten nach fünf bis sechs Tagen erste adhärierende und wachsende Zellhaufen beobachtet werden, die die typische polygonale „Pflasterstein“-artige Endothelzellmorphologie aufwiesen und durchschnittlich bis zu Passage 23 expandiert werden konnten. Allerdings konnten nur Zellen aus Nabelschnurblut erfolgreich expandiert werden. Trotz optimierter Kultivierungsbedingungen konnten keine Langzeitkulturen aus der mononukleären Zellfraktion gesunder Probanden angelegt werden. Die Verwendung von Heparin oder EDTA bei der Gewinnung der Blutproben zeigte keinen Unterschied auf das Wachstumsvermögen der Zellen. Ein wichtiges Kriterium war der Zeitraum vom Zeitpunkt der Abnahme bis zur Isolierung der Zellen. Je kürzer dieser Zeitraum war, desto erfolgreicher war die Kultivierung der EPC. Deshalb wurden die Blutproben im folgenden innerhalb der ersten vier Std. nach Entnahme aufbereitet. Aufgrund der geringen Zellzahlen konnte keine *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS)-Analyse durchgeführt werden, um den Prozentsatz der CD34<sup>+</sup>-Zellen zu bestätigen, beziehungsweise um die Koexpression von CD34 und weiterer Endothelzell-spezifischer Marker in den Zellen zu untersuchen.

Insgesamt wurden von drei Kindern HIV-1-negativer und von acht nicht-infizierten Kindern HIV-1-positiver Mütter EPC aus dem Nabelschnurblut erfolgreich isoliert und expandiert (Tabelle 3.1). Der Nachweis, dass die Kinder der HIV-1-Gruppe nicht-infiziert waren, wurde mittels PCR unmittelbar nach der Geburt geführt und im Zeitraum der ersten 10 Lebensmonate vier mal wiederholt (persönliche Mitteilung des behandelnden Arztes).



**Abb. 3: Morphologie isolierter EPC am fünften Tag nach Isolierung.**

Fünf Tage nach der Isolierung konnten erste adhärierende und wachsende Zellhaufen beobachtet werden, die die typische polygonale „Pflasterstein“-artige Endothelzellmorphologie aufwiesen. Nicht-adhärierende Zellen waren hell mit runder Morphologie (schwarzer Pfeil). Phasenkontrastaufnahmen, Vergrößerung 10fach.

### **3.1.2 Isolierung von differenzierten Endothelzellen aus der Nabelschnur**

Differenzierte Endothelzellen wurden aus der Nabelschnurvene (HUVEC) oder -arterie (HUAEC) von Kindern HIV-1-infizierter Mütter nach der Methode von Jaffe und Mitarbeitern isoliert (Jaffe *et al.*, 1973).

Nabelschnurgewebe wurde mit Kollagenase behandelt und die herausgelösten Zellen mehrmals gewaschen und nachfolgend in Kulturflaschen, die mit Gelatine beschichtet waren, ausgebracht. Im Gegensatz zu EPC adhärten differenzierte Endothelzellen innerhalb von zwei Std. nach Isolierung am Boden des Kulturgefäßes. Nicht-haftende Zellen wurden nach zwei Std. abgenommen. Es konnte in keiner der Kulturen eine Kontamination mit Zellen anderer Morphologie beobachtet werden. Insgesamt wurden drei Kulturen HUVEC und eine Kultur HUAEC von Kindern HIV-1-positiver Mütter angelegt (Tabelle 3.1).

Nachfolgend wird in der Arbeit für die untersuchten Zellkulturen folgende Nomenklatur verwendet: Der HIV-1-Status der Mutter wird durch HIV-1 (infiziert) oder N (nicht infiziert) bezeichnet. Danach folgt die Bezeichnung der Zellart (EPC, HUVEC und HUAEC). Die Zahl in Klammer bezieht sich auf den Spender. Zellen mit gleichen Zahlen wurden vom selben Spender angelegt, was nur bei Kindern der HIV-1-Gruppe möglich war. Zum Beispiel bezeichnet die Angabe HIV-EPC(1), EPC des

Kindes der ersten HIV-1-infizierten Mutter. N-EPC(3) bezeichnet EPC des Kindes der dritten nicht-infizierten Mutter. Alle untersuchten Zellkulturen sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Dabei soll nochmals darauf hingewiesen werden, dass in dieser Arbeit ausschließlich differenzierte Endothelzellen von Kindern der HIV-1-Gruppe isoliert wurden. HUVEC der N-Gruppe wurden kommerziell erworben, weshalb in der N-Gruppe keine differenzierten Endothelzellen und EPC von demselben Donor vorhanden waren.

**Tabelle 3.1: Untersuchte Endothelzellen.**

<b>Donor</b>	<b>Abstammung differenzierter Endothelzellen</b>
<b>Mutter: HIV-1-positiv = HIV-1-Gruppe</b>	
HIV-HUVEC(1)	Vene
HIV-EPC(1)	
HIV-HUVEC(2)	Vene
HIV-EPC(2)	
HIV-HUAEC(3)	Arterie
HIV-EPC(3)	
HIV-HUVEC(4)	Vene
HIV-EPC(5)	
HIV-EPC(6)	
HIV-EPC(7)	
HIV-EPC(8)	
HIV-EPC(9)	
<b>Mutter : HIV-1-negativ = N-Gruppe</b>	
N-HUVEC(1)*	Vene
N-HUVEC(2)*	Vene
HMVEC*	Haut
N-EPC(3)	
N-EPC(4)	
N-EPC(5)	
N-EPC(6)**	
N-EPC(7)**	
N-EPC(8)**	

\* Zellen kommerziell erworben

\*\* EPC zur Verfügung gestellt von R. Oostendorp und U. Keller (TU München, Klinikum rechts der Isar, III. Med. Klinik u. Poliklinik)

EPC: endotheliale Vorläuferzellen (*Endothelial Precursor Cells*)

HUVEC: Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*)

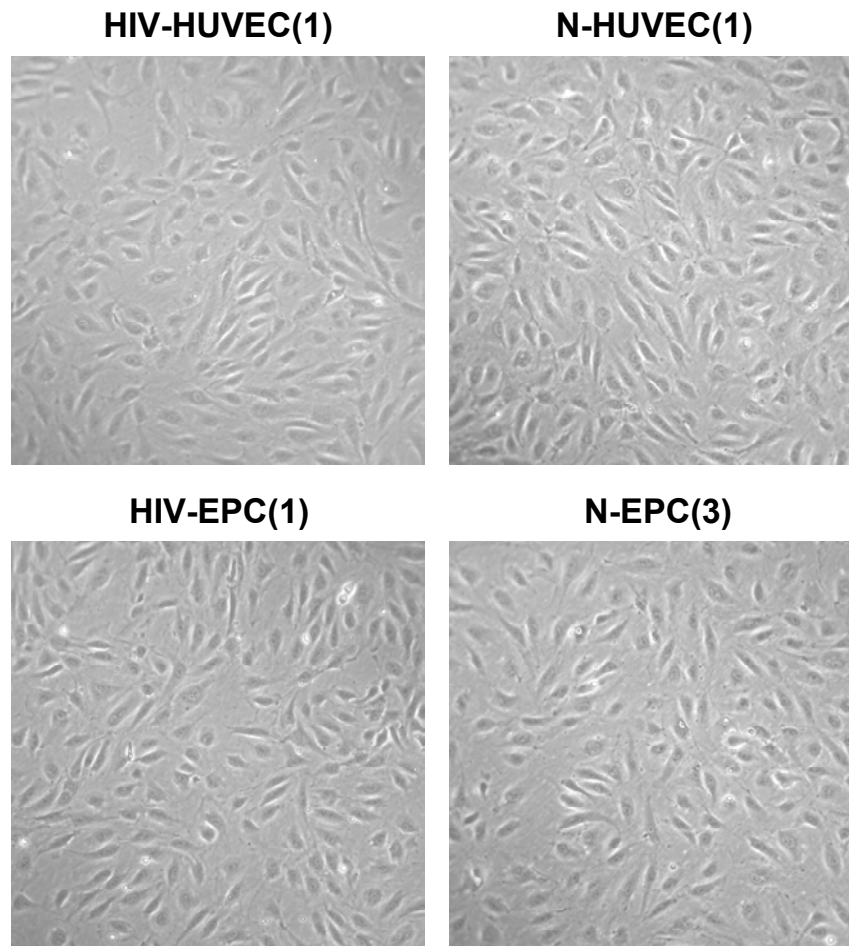
HUAEC: Endothelzellen aus der Nabelschnurarterie (*Human Umbilical Artery Endothelial Cells*)

Die Nomenklatur der Zellen ist wie folgt: Der HIV-1-Status der Mutter wird durch HIV-1 (infiziert) oder N (nicht infiziert) bezeichnet. Danach folgt die Bezeichnung der Zellart (EPC, HUVEC und HUAEC). Die Zahl in Klammer bezieht sich auf den Spender. Zellen mit gleichen Zahlen wurden vom selben Spender angelegt. Zum Beispiel bezeichnet die Angabe HIV-EPC(1), EPC des Kindes der ersten HIV-1-infizierten Mutter, N-EPC(3) bezeichnet EPC des Kindes der dritten nicht-infizierten Mutter.

### **3.2 Vergleich der Morphologie von EPC und HUVEC der HIV-1- und der N-Gruppe**

Um zu untersuchen, ob sich HUVEC und EPC aus der HIV- und aus der N-Gruppe bezüglich ihrer Morphologie unterscheiden, wurden EPC und HUVEC ( $2 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>) der Passage 4 in Zellkulturgefäßen, die mit Gelatine beschichtet waren, ausgebracht und einen Tag in Vollmedium (EBM-Medium mit 5% FKS) kultiviert.

Sowohl HUVEC und EPC der HIV-1-Gruppe [Abb. 4, HIV-HUVEC(1), HIV-EPC(1)] als auch HUVEC und EPC der N-Gruppe [Abb. 4, N-HUVEC(1), N-EPC(3)] bildeten einen homogenen Zellrasen aus polygonalen „Pflasterstein“-artigen Zellen mit typischer endothelialer Morphologie. In keiner der angelegten Kulturen wurden Zellen mit anderer Morphologie beobachtet.



**Abb. 4: Vergleich der Morphologie differenzierter Endothelzellen und EPC.**

Isolierte HUVEC [HIV-HUVEC(1) und N-HUVEC(1)] und EPC [HIV-EPC(1) und N-EPC(3)] von Kindern der HIV-1- und der N-Gruppe wiesen die gleiche Morphologie auf. Phasenkontrastaufnahmen, Vergrößerung 10fach.

### **3.3 Lebensdauer von HUVEC, HUAEC, EPC und HMVEC**

Primäre Zellkulturen unterscheiden sich von Zelllinien durch ihre begrenzte Lebensdauer in Kultur. Es sollte das Überleben von HIV-HUVEC und HIV-EPC mit dem von N-HUVEC und N-EPC verglichen werden. Als zusätzliche Kontrolle sollten humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMVEC) einer HIV-1-negativen Person verwendet werden.

Um die Lebensdauer der verschiedenen Kulturen zu vergleichen, wurde überprüft, wie oft diese passagiert werden können. Eine Passage beinhaltet eine Vervierfachung der Zellen (siehe Material und Methoden).

Da bisher nur wenige Untersuchungen zur Langzeitkultivierung von EPC vorlagen, war es von Interesse festzustellen, ob die von CD34<sup>+</sup>-Zellen abstammenden EPC ein unterschiedliches Wachstumsvermögen zu HUVEC aufweisen. Außerdem sollte untersucht werden, ob die HIV-1-Infektion der Mutter das Passagierverhalten der Endothelzellen beeinflusst.

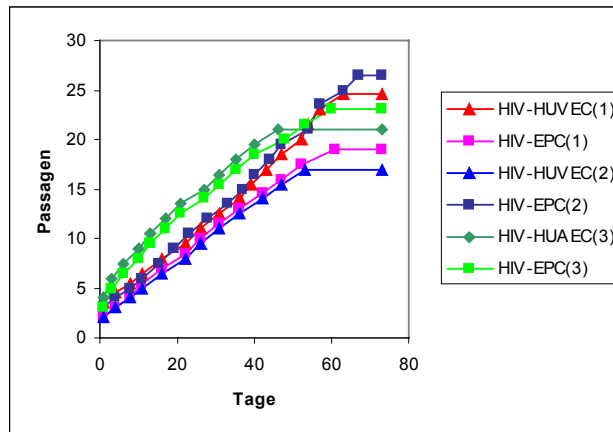
Es wurden drei EPC-Kulturen, zwei HUVEC- und eine HUAEC-Kultur von den Spendern der HIV-1-Gruppe und drei EPC-Kulturen und eine HUVEC-Kultur von vier Spendern der N-Gruppe verglichen. Zudem wurden HMVEC bei diesem Experiment als Kontrolle mitgeführt. Alle Zellen wurden in gelatinisierten Kulturgefäßen in Vollmedium kultiviert.

Es zeigte sich kein Unterschied zwischen HUVEC, HUAEC und EPC der HIV-1-Gruppe und ebenso kein Unterschied zwischen HUVEC und EPC der N-Gruppe. In einem Zeitraum von 73 Tagen erreichten die Zellen zwischen 17 und 26,5 Passagen [Abb. 5A, durchschnittliche Passagenzahl HIV-HUVEC/HUAEC (Dreiecke),  $21 \pm 3,7$ ; HIV-EPC (Quadrate),  $23 \pm 3,7$ ; Abb. 5B, N-HUVEC (Dreiecke), N-EPC (Quadrate),  $23 \pm 3,3$ ]. Der Zeitabstand zwischen den Passagen war etwa fünf Tage. HMVEC (Punkte) konnten nur 20 Tage bis zu Passage 9 kultiviert werden, danach stagnierte das Wachstum.

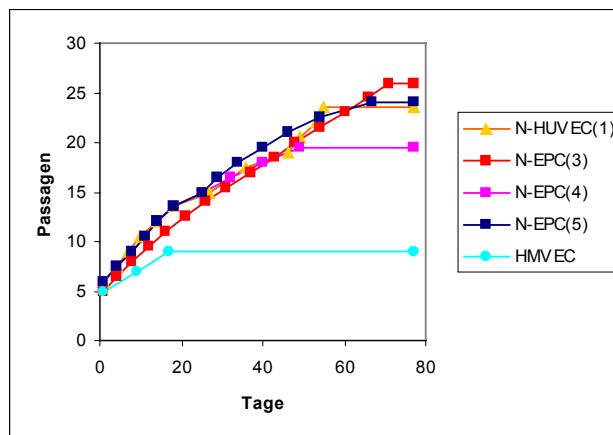
Dies zeigte, dass die HIV-1-Infektion der Mutter die Lebensdauer der Endothelzellen des Kindes nicht beeinflusste und dass EPC *in vitro* im Vergleich zu HUVEC und HUAEC keine erhöhte Passagierfähigkeit besitzen. Einzig HMVEC zeigten eine deutlich reduzierte Lebensdauer. Die Übersicht der durchschnittlichen Passagenzahlen ist in Abb. 5C dargestellt.



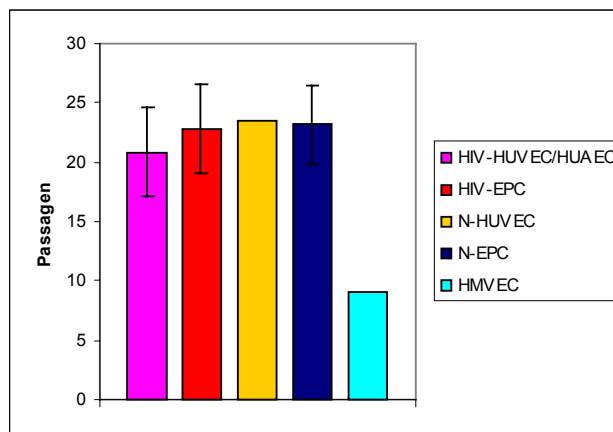
**A**



**B**



**C**



**Abb. 5: Passagierfähigkeit von HUVEC, HMVEC und EPC.**

Bestimmung der maximalen Passagenzahl verschiedener Endothelzell-Arten von Kindern der HIV-1- (A) und der N-Gruppe (B). Sowohl EPC als auch HUVEC und HUAEC (Dreiecke) waren in einem Zeitraum von 73 Tagen 17- bis 26,5-mal passagierbar, unabhängig vom Infektionsstatus der Mutter.

Im Gegensatz dazu konnten HMVEC (Punkte) nur 20 Tage bis zur neunten Passage kultiviert werden. Das Balkendiagramm (C) zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Passagierungen von HIV-HUVEC/HUAEC (drei Spender,  $21 \pm 3,7$ ) und HIV-EPC (drei Spender,  $23 \pm 3,7$ ) sowie N-EPC (drei Spender,  $23 \pm 3,3$ ). Für N-HUVEC und HMVEC (jeweils ein Spender) entfällt die Statistik.

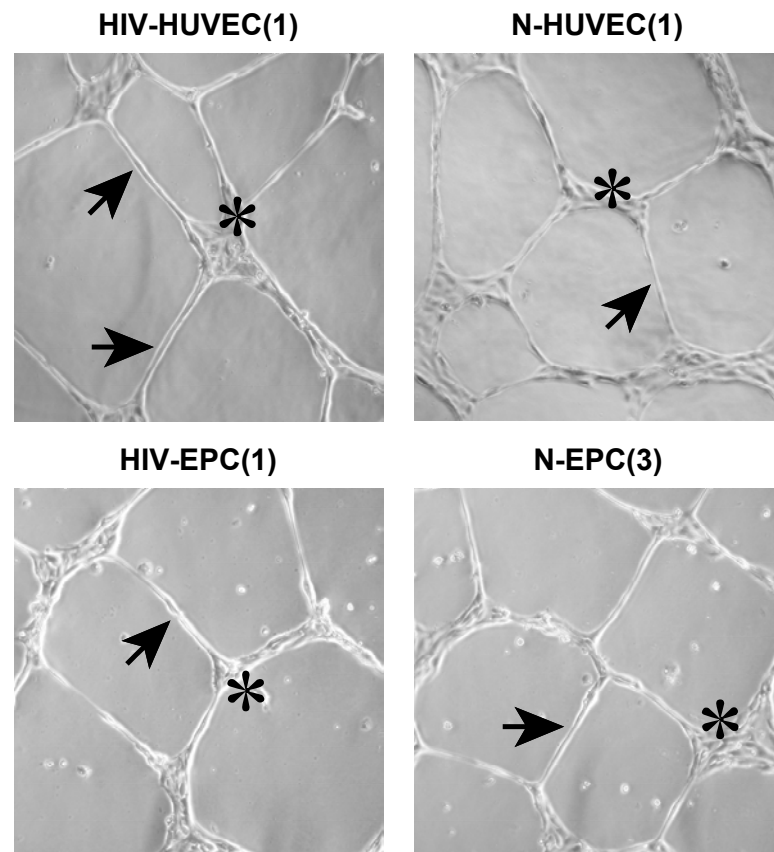
### **3.4 Die Kapillarbildungsfähigkeit von EPC und HUVEC wird von der HIV-1-Infektion der Mutter nicht beeinflusst**

Die Ausbildung kapillar-ähnlicher Strukturen auf einer rekonstituierten Basalmembranmatrix (Matrigel) ist ein charakteristisches Merkmal von Endothelzellen. Als Hauptkomponenten enthält Matrigel Laminin, Kollagen Typ IV, Entactin und Heparansulfat-Proteoglykan (Kleinman *et al.*, 1982). Es wird eingesetzt, um die Adhäsion oder Differenzierung unterschiedlicher Zellen, darunter auch vaskulärer Endothelzellen (Kubota *et al.*, 1988), zu untersuchen. Darüber hinaus dient es als Substrat, um die Fähigkeit zur Kapillarbildung von Endothelzellen zu analysieren.

Um zu untersuchen, ob zwischen Endothelzellen der HIV-1- und der N-Gruppe sowie zwischen EPC und HUVEC Unterschiede in der Fähigkeit zur Ausbildung kapillar-ähnlicher Strukturen auf Matrigel bestehen, wurde jeweils eine Zellpopulation auf Matrigel kultiviert.

Es wurden HUVEC und EPC ( $3 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>) von Kindern der HIV-1-Gruppe [Abb. 6, HIV-HUVEC(1), HIV-EPC(1)] und der N-Gruppe [Abb. 6, N-HUVEC(1), N-EPC(3)] auf Matrigel ausgebracht und in Low Medium (EBM mit 0,5% FKS) mit den angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF (je 10 ng/ml) für 24 Std. kultiviert.

In keinem Fall konnten Unterschiede zwischen Zellen der HIV-1-Gruppe und der N-Gruppe sowie zwischen HUVEC und EPC beobachtet werden. In Matrigel bildeten alle Kulturen kapillar-ähnliche Strukturen aus (Abb. 6). Sowohl die Anzahl der Verzweigungspunkte (Abb. 6, Stern) als auch die Länge der Verbindungskapillaren (Abb. 6, Pfeile) waren in allen untersuchten Kulturen vergleichbar.



**Abb. 6: Kapillarbildungsfähigkeit von HUVEC und EPC in Matrigel.**

HUVEC und EPC von Kindern der HIV-1-Gruppe [HIV-HUVEC(1), HIV-EPC(1)] und der N-Gruppe [N-HUVEC(1), N-EPC(3), jeweils  $3 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>] wurden auf Matrigel ausgebracht und in Anwesenheit angiogener Wachstumsfaktoren für 24 Stunden inkubiert. Sowohl HUVEC als auch EPC bildeten, unabhängig vom HIV-1-Status der Mutter, kapillar-ähnliche Strukturen aus. Die Kapillarnetzwerke sind charakterisiert durch Verzweigungspunkte (Stern) und Verbindungskapillaren (Pfeil). HUVEC und EPC unterschieden sich bezüglich ihrer Kapillarbildungsfähigkeit nicht. Phasenkontrastaufnahmen, Vergrößerung 10fach.

### 3.5 Nachweis charakteristischer Endothelzellmarker in EPC, HUVEC und HMVEC

Zur weiteren Charakterisierung der isolierten Zellen wurde die Expression etablierter Endothelzellmarker vergleichend untersucht.

### **3.5.1 Expression konstitutiv exprimierter Endothelzellmarker (CD31, CD105) und der Aufnahme von acetyliertem *Low Density* Lipoprotein**

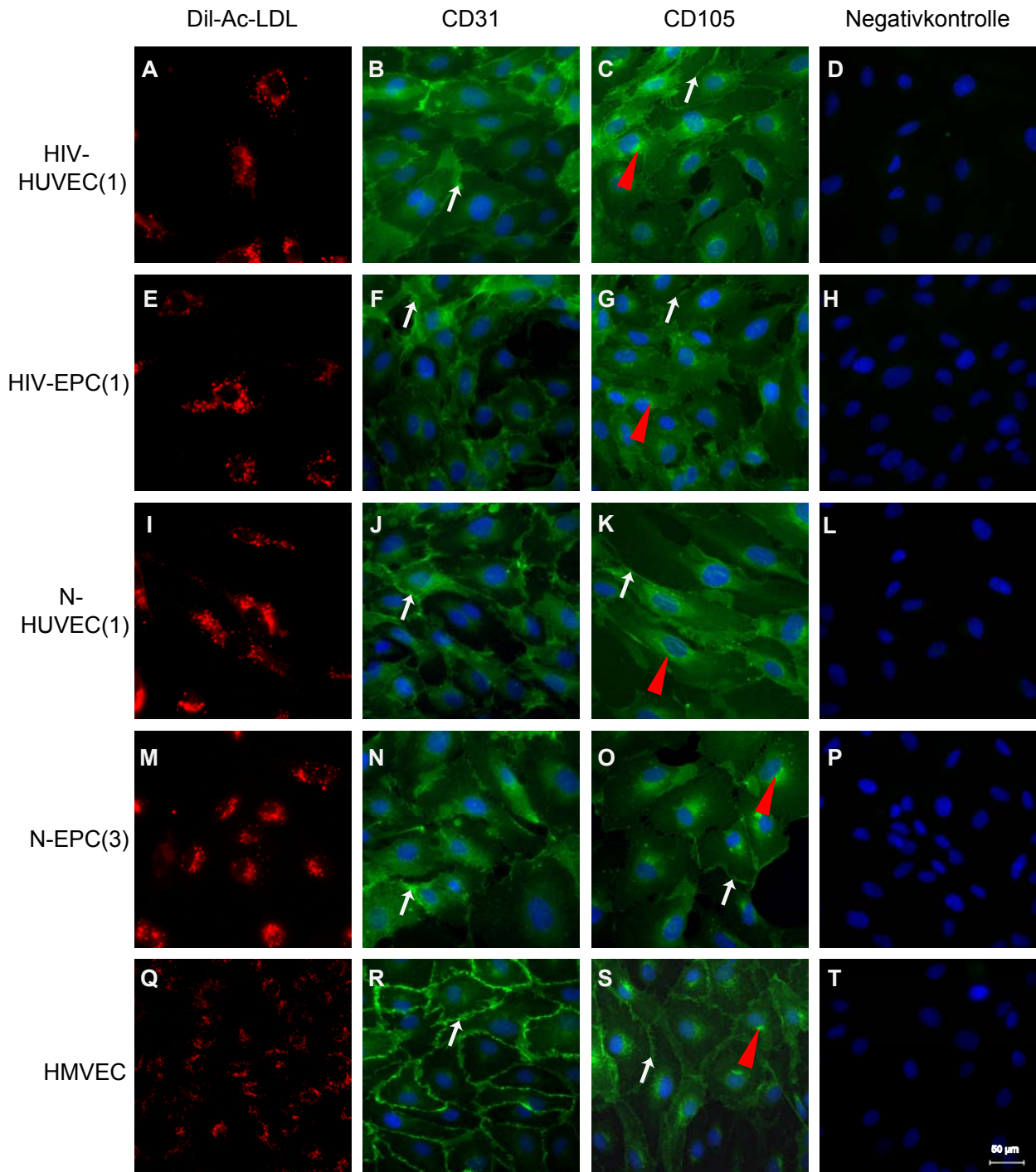
In einem ersten Schritt wurden konstitutive Endothelzellmarker wie die Aufnahme von acetyliertem *Low Density* Lipoprotein (Dil-Ac-LDL) durch den *Scavenger* Rezeptor I und die Expression der Oberflächenmarker CD31 und CD105 bestätigt (Tabelle 1.1).

HUVEC (Abb. 7 A, I) und EPC (Abb. 7 E, M) sowohl der HIV-1- als auch der N-Gruppe und HMVEC (Abb. 7 Q) nahmen Dil-Ac-LDL auf (rote Fluoreszenz).

Auch CD31 (grüne Fluoreszenz) wurde sowohl von HUVEC (Abb. 7 B, J) als auch von EPC (Abb. 7 F, J), unabhängig vom HIV-1-Status der Mutter, und von HMVEC (Abb. 7 R) exprimiert. Das CD31-Antigen ist in der Plasmamembran (weißer Pfeil) exprimiert, was besonders deutlich bei HMVEC (Abb. 7 R) zu beobachten war.

CD105 (grüne Fluoreszenz) war in HUVEC (Abb. 7 C, K), EPC (Abb. 7 G, O) und HMVEC (Abb. 7 S) im Zytoplasma (weißer Pfeil) und mit erhöhter Konzentration im perinukleären Bereich (rotes Dreieck) nachweisbar. Es waren keine Unterschiede zwischen Endothelzellen von Kindern der HIV-1- und der N-Gruppe sowie HMVEC zu beobachten. Bei der Kontrollfärbung ohne den ersten Antikörper wurde in keinem Falle eine Färbung beobachtet (Abb. 7 D, H, L, P, T).

Alle untersuchten konstitutiven Endothelzellmarker waren somit gleichermaßen in EPC und HUVEC der HIV-1- und auch der N-Gruppe nachweisbar.



**Abb. 7: Immunfluoreszenz-Nachweis charakteristischer Endothelzellmarker in HUVEC, HMVEC und EPC.**

Unabhängig vom HIV-1-Status der Mutter nahmen HUVEC (A, I), EPC (E, M) und mikrovaskuläre Endothelzellen (HMVEC, Q) acetyliertes *Low Density* Lipoprotein (Dil-Ac-LDL, rote Fluoreszenz) auf. Sämtliche Zellarten der HIV-1- und der N-Gruppe exprimierten das Oberflächenmolekül CD31 (B, F, J, N, R; grüne Fluoreszenz) in der Plasmamembran (weißer Pfeil). CD105 (grüne Fluoreszenz) war ebenfalls in HUVEC (C, K), EPC (G, O) und HMVEC (S) der HIV-1- und der N-Gruppe nachweisbar. Das Protein war sowohl im Zytoplasma (weißer Pfeil) und mit erhöhter Konzentration im perinukleären Bereich (rotes Dreieck) nachweisbar. Die Negativkontrolle wurde unter identischen Bedingungen

durchgeführt, ohne Inkubation mit dem ersten Antikörper (D, H, L, P, T). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blaue Fluoreszenz). Laser Scanning Mikroskop (LSM)-Aufnahmen, Vergrößerung 40fach.

### **3.5.2 Expression von ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin und vWF in HUVEC, EPC und HMVEC nach Stimulation mit inflammatorischen Zytokinen**

Neben angiogenen Wachstumsfaktoren spielen auch inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  bei Vaskulopathien eine wichtige Rolle, indem sie in Endothelzellen die Expression einer Reihe von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 induzieren, die *in vivo* die Anheftung von Leukozyten an das Endothel steuern.

Zur weiteren Charakterisierung der isolierten Zellen, sollte die Expression dieser induzierbaren Marker nach Behandlung mit inflammatorischen Zytokinen untersucht werden. HUVEC, EPC und HMVEC wurden auf gelatinisierten 8-Kammer-Objektträgern ausgebracht und mit IL-1 $\beta$  (200 U/ml) für 14 Std. (für den Nachweis von ICAM-1, E-Selektin und vWF) oder mit TNF $\alpha$  (300 U/ml) für 8 Std. (für den Nachweis von VCAM-1) inkubiert. Zur Stimulierung der Endothelzellen wurden die Konzentrationen der inflammatorischen Zytokine entsprechend der Publikation von Guenzi und Mitarbeitern eingesetzt (Guenzi *et al.*, 2001). Als Negativkontrollen wurden nicht-behandelte Zellen immunzytochemisch gefärbt.

In unbehandelten HUVEC (Abb. 8 A, E), EPC (Abb. 8 C, G) und HMVEC (Abb. 8 I) wurde ICAM-1 nicht exprimiert. Nach Inkubation mit IL-1 $\beta$  (200 U/ml) für 14 Std. war in allen Endothelzellkulturen, unabhängig vom HIV-1-Status der Mutter, eine deutliche Expression von ICAM-1 (grüne Fluoreszenz) sichtbar (Abb. 8 B, D, F, H, J). Interessanterweise scheinen nicht alle Zellen in einer Kultur ICAM-1 zu exprimieren.

VCAM-1 war ebenfalls in unbehandelten Zellen nicht nachweisbar (Abb. 8 K, M, O, Q, S). Nach Stimulation mit TNF $\alpha$  (300U/ml) für 8 Std. war VCAM-1 (grüne Fluoreszenz) in HUVEC (Abb. 8 L, P) und EPC (Abb. 8 N, R) in der überwiegenden Zahl der Zellen exprimiert und in HMVEC (Abb. 8 T) in deutlich geringerem Anteil (< 35%). Es trat kein Unterschied zwischen Endothelzellen von Kindern der HIV-1- und der N-Gruppe auf.

E-Selektin wurde in unbehandelten HUVEC (Abb. 9 A, E), EPC (Abb. 9 C, G) und HMVEC (Abb. 9 I) nicht exprimiert. Nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  (200 U/ml) für 14 Std.

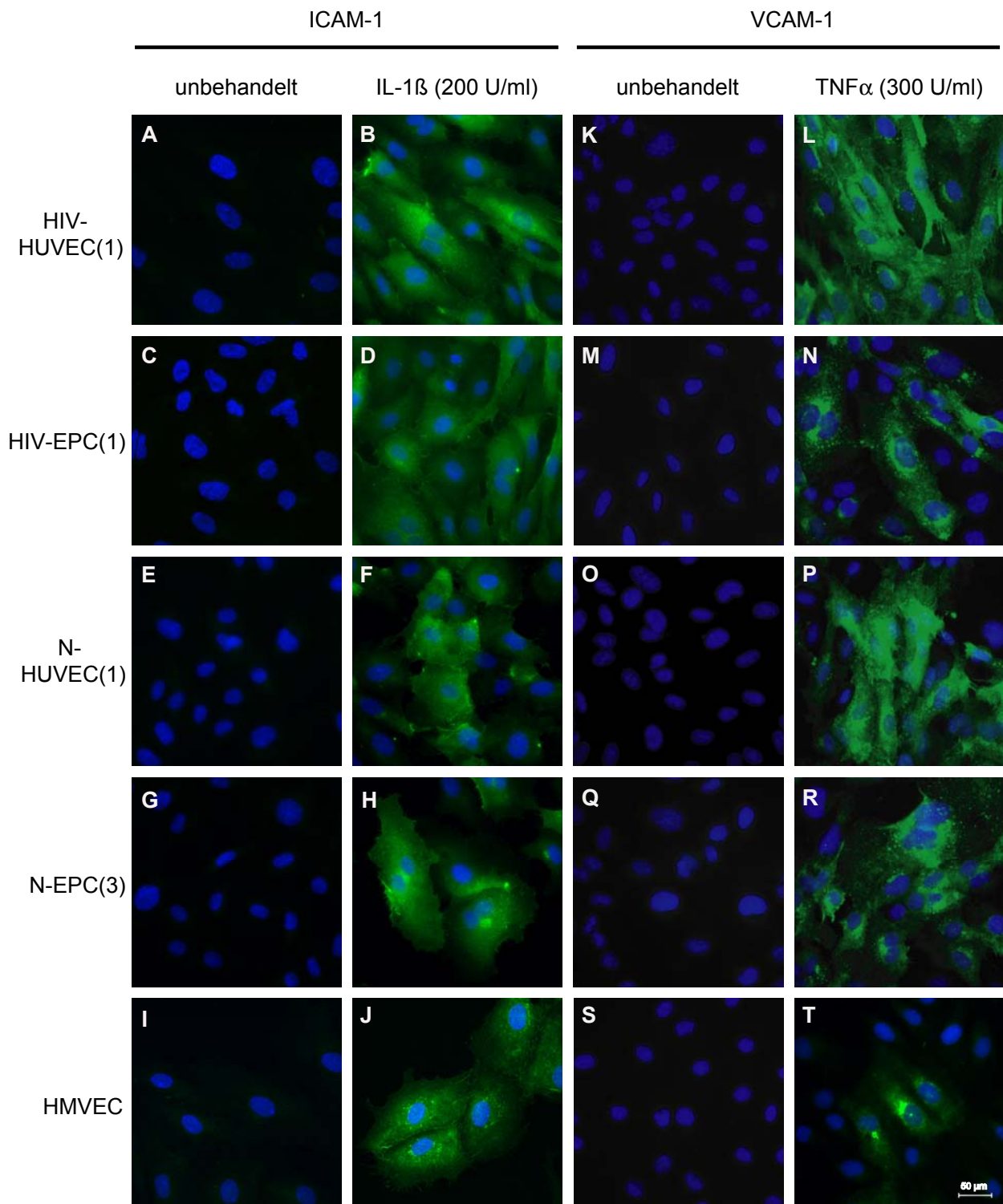
war in allen Kulturen HUVEC (Abb. 9 B, F), EPC (Abb. 9 D, H) und HMVEC (Abb. 9 J) dieses Adhäsionsmolekül nachweisbar (grüne Fluoreszenz).

Im Gegensatz zu den Adhäsionsmolekülen war vWF in unbehandelten HUVEC (Abb. 9 K, O), EPC (Abb. 9 M, Q) und HMVEC (Abb. 9 S) konstitutiv vorhanden (grüne Fluoreszenz). Nach der Behandlung mit IL-1 $\beta$  (200 U/ml) für 14 Std. wurde in allen Kulturen ein deutlicher Rückgang der Signalintensität beobachtet (Abb. 9 L, P, N, R). In HMVEC konnte nach IL-1 $\beta$ -Behandlung vWF nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 9 T).

Diese Untersuchungen zeigten, dass die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin in allen untersuchten Endothelzellkulturen nach Stimulation mit inflammatorischen Zytokinen erhöht war und umgekehrt, die intrazelluläre Konzentration von vWF verringert wurde.

In keinem Falle konnten Unterschiede zwischen EPC und HUVEC beziehungsweise Unterschiede in Bezug auf die HIV-1-Infektion der Mutter nachgewiesen werden. Alle Zellen waren positiv für CD31, CD105 und die Aufnahme von Ac-LDL. Sie exprimierten nach Behandlung mit inflammatorischen Zytokinen ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin und verringerten die intrazelluläre Konzentration von vWF.

Da mit den bisherigen Versuchen keine Unterschiede zwischen den untersuchten Zellarten in Wachstum, Morphologie, der Fähigkeit zur Ausbildung kapillarer Strukturen auf Matrigel und der Expression typischer Endothelzellmarker gefunden wurden, wurden mittels *Makroarray* Analyse die Genexpressionsprofile dieser Zellen verglichen.

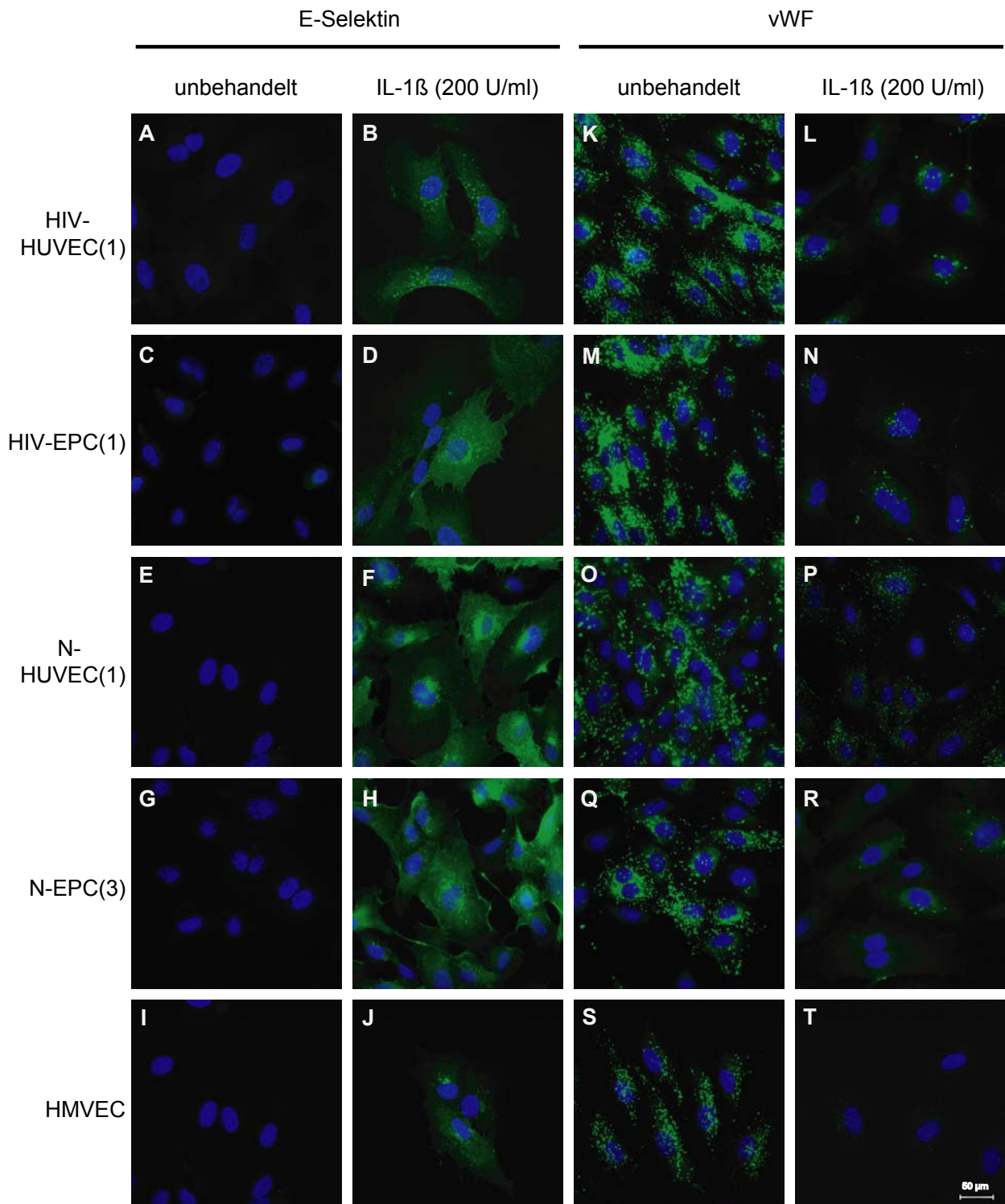


**Abb. 8: Immunfluoreszenz-Nachweis der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 in HUVEC, EPC und HMVEC.**

HUVEC (A, B, E, F), EPC (C, D, G, H) und HMVEC (I, J) wurden 14 Stunden mit IL-1 $\beta$  (200 U/ml) inkubiert oder unbehandelt gelassen. In unbehandelten Zellen war ICAM-1 entweder nicht (A, C, E, G) oder nur in geringem Ausmaß (I) nachweisbar. Nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  waren alle Zellen stark positiv für ICAM-1 (B, D, F, H, J; grüne Fluoreszenz).



HUVEC (K, L, O, P), EPC (M, N, Q, R) und HMVEC (S, T) wurden 8 Stunden ohne oder mit  $\text{TNF}\alpha$  (300 U/ml) inkubiert. VCAM-1 war in nicht-stimulierten HUVEC, HMVEC und EPC nicht nachweisbar (K, M, O, Q, S). Nach Inkubation mit  $\text{TNF}\alpha$  konnte die Expression von VCAM-1 bei HUVEC und EPC in der Mehrzahl der Zellen (L, N, P, R, T; grüne Fluoreszenz) und bei HMVEC in deutlich geringerem Umfang (T) nachgewiesen werden. HUVEC und EPC von Kindern der HIV-1- und der N-Gruppe sowie HMVEC unterschieden sich nicht bezüglich der Expression von ICAM-1 und VCAM-1. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blaue Fluoreszenz). LSM-Aufnahmen, Vergrößerung 40fach.



**Abb. 9: Immunfluoreszenz-Nachweis von E-Selektin und von Willebrand Faktor in HUVEC, EPC und HMVEC.**

HUVEC (A, E, B, F), EPC (C, D, G, H) und HMVEC (I, J) wurden 14 Stunden ohne oder mit IL-1 $\beta$  (200 U/ml) inkubiert. E-Selektin war in unstimulierten Zellen nicht exprimiert (A, C, E, G, I). Nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  waren alle Zellen positiv für E-Selektin (B, D, F, H, J; grüne Fluoreszenz). HUVEC und EPC von Kindern der HIV-1- und der N-Gruppe sowie HMVEC unterschieden sich nicht bezüglich der Expression von E-Selektin.

In unbehandelten Zellen war von Willebrand Faktor (vWF) in allen Kulturen nachweisbar (K, M, O, Q, S; grüne Fluoreszenz). Nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  für 14 Stunden war vWF in HUVEC (L, P) und EPC (N, R) deutlich reduziert. Nach IL-1 $\beta$ -Stimulierung konnte vWF in HMVEC (T) nicht mehr nachgewiesen werden. HUVEC und EPC von Kindern der HIV-1- und der N-Gruppe unterschieden sich bezüglich der Expression von vWF nicht. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blaue Fluoreszenz). LSM-Aufnahmen, Vergrößerung 40fach.

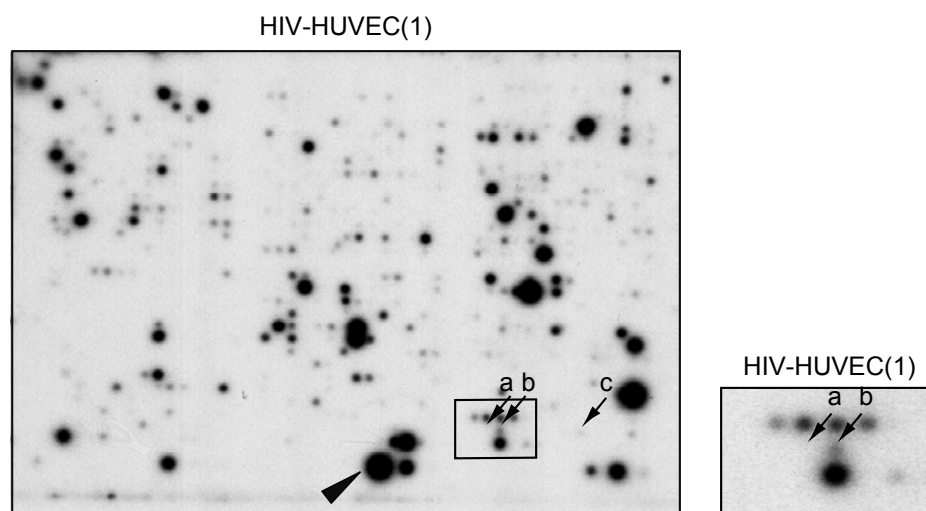
### **3.6 Identifizierung differentiell exprimierter Gene in HUVEC und EPC von Kindern der HIV-1- und der N-Gruppe**

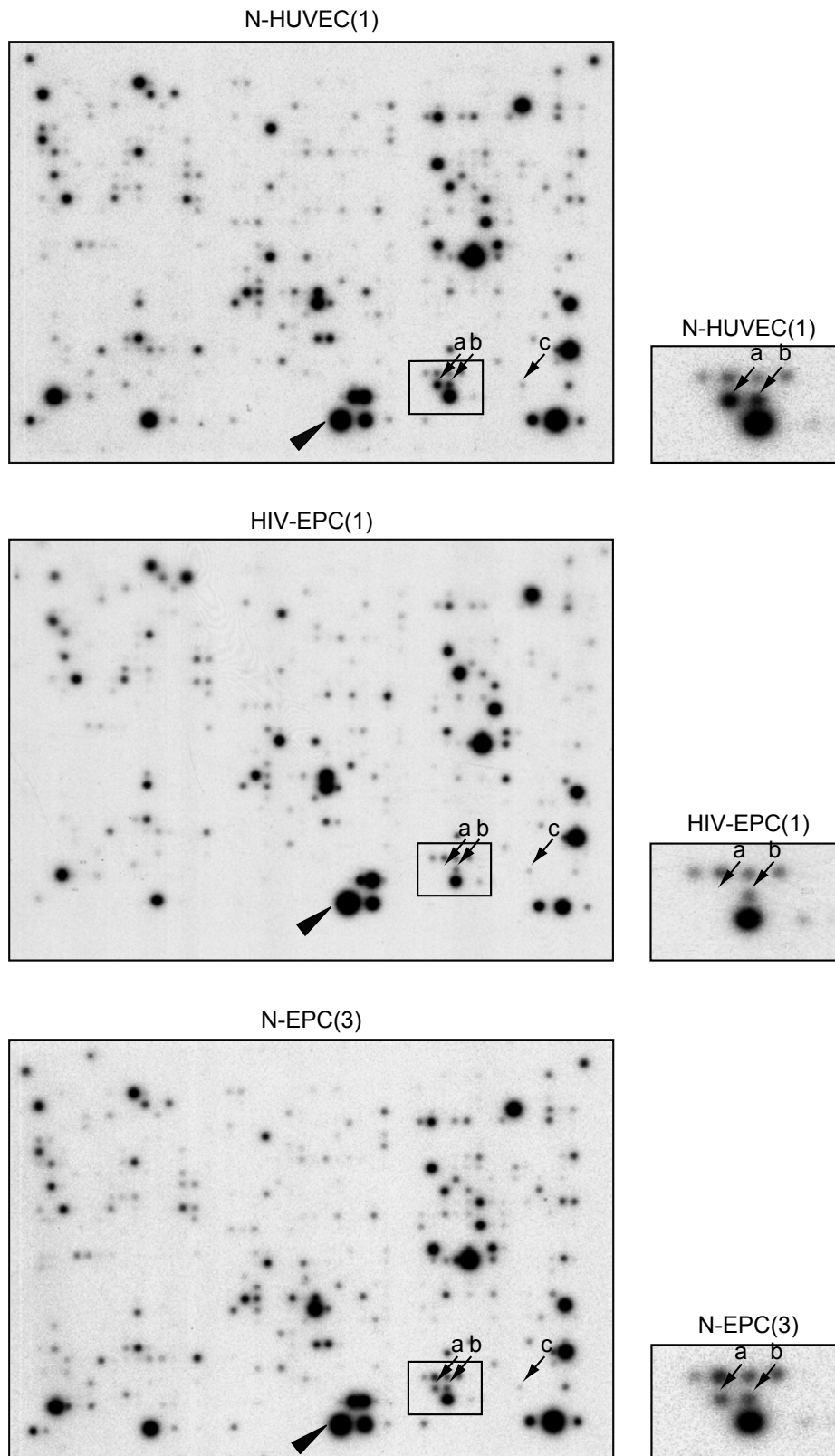
Um zu untersuchen, ob relevante Unterschiede zwischen Endothelzellen der HIV-1- und der N-Gruppe sowie zwischen EPC und HUVEC bestehen, wurde das Genexpressionsprofil jeweils einer Kultur von EPC und von HUVEC der HIV-1- und der N-Gruppe mittels cDNA-Hybridisierung von *Makroarray* Membranen verglichen. Die Filtermembran (Clontech, Atlas<sup>TM</sup> Human 1.2 Array) umfasste 1176 humane cDNAs, die ein weites Spektrum unterschiedlicher Genprodukte abdeckte wie z. B. Transkriptionsfaktoren, Onkogene, Tumorsuppressorgene, Regulatoren des Zellzyklus und der Signaltransduktion, Zelloberflächenantigene, Matrix-Metalloproteinasen und Haushaltsgene. Jede der gespotteten cDNAs war zwischen 200 bis 800 bp lang und enthielt keine repetitiven Sequenzen oder Homologien zu anderen Genen.

Für die Hybridisierung wurde RNA aus EPC und HUVEC in der Passage zwischen 3,5 – 4 eingesetzt. Die Kulturen waren sowohl von der HIV-1-Gruppe (ein Donor) und der N-Gruppe (zwei unterschiedliche Donoren) und wurden vor der Isolierung der RNA für 24 Std. in Vollmedium kultiviert.

Die vergleichende Auswertung der Hybridisierungsergebnisse zeigte, dass die Expression von Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1) sowohl in HUVEC [Abb. 10, HIV-HUVEC(1)] als auch in EPC [Abb. 10, HIV-EPC(1)] der HIV-1-Gruppe unter der

Nachweisgrenze war (schwarzer Pfeil a, Rahmen). Im Gegensatz dazu synthetisierten HUVEC [Abb. 10, N-HUVEC(1)] und EPC [Abb. 10, N-EPC(3)] der N-Gruppe die MMP-1-RNA. Zudem erschien die MMP-1-Expression in EPC der N-Gruppe [Abb. 10, N-EPC(3)] etwas geringer als in differenzierten Endothelzellen [Abb. 10, N-HUVEC(1)]. MMP-2 (schwarzer Pfeil b, Rahmen) war in HUVEC [Abb. 10, HIV-HUVEC(1), N-HUVEC(1)] und EPC [Abb. 10, HIV-EPC(1), N-EPC(3)] der HIV-1- und der N-Gruppe deutlich nachweisbar, wohingegen MT1-MMP (Abb. 10, schwarzer Pfeil c) in Endothelzellen beider Gruppen nur schwach exprimiert wurde. Der Nachweis des Haushaltsgenes Glycerinaldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, schwarzes Dreieck) zeigte, dass in Endothelzellen der HIV-1-Gruppe [Abb. 10, HIV-1-HUVEC(1) und HIV-1-EPC(1)] mehr radioaktiv markierte cDNA eingesetzt wurde. Auf einem kürzer exponierten Film waren die Unterschiede deutlicher zu sehen (Daten nicht gezeigt). Dies belegt, dass die unterschiedlichen Signale für die MMP-1-RNA nicht auf Unterschiede in der Konzentration der Hybridisierungssonden zurückzuführen waren. Da von MMP-1 bisher keine unterschiedlichen Spleißvarianten bekannt sind, kann ausgeschlossen werden, dass das ausgebrachte cDNA-Fragment durch die MMP-1-Sonde nicht erkannt wurde.





**Abb. 10: Identifizierung differentiell exprimierter Gene in HUVEC und EPC aus Kindern der HIV-1-Gruppe und der N-Gruppe mit Makroarray.**

Hybridisierung von *Makroarray* Membranen [Atlas™ Human 1.2 Array (Clontech)] mit radioaktiv markierter cDNA von HUVEC [HIV-HUVEC(1), N-HUVEC(1)] und EPC [HIV-EPC(1), N-EPC(3)] aus

der Nabelschnur von Kindern der HIV-1- und der N-Gruppe. MMP-1 (schwarzer Pfeil a) war in HUVEC und EPC [N-HUVEC(1), N-EPC(3)] der N-Gruppe, aber nicht in HUVEC und EPC [HIV-HUVEC(1), HIV-EPC(1)] der HIV-1-Gruppe nachweisbar. Der vergrößerte Ausschnitt verdeutlicht das Fehlen eines Signals für die MMP-1-Expression in HUVEC und EPC des Kindes der HIV-1-Gruppe im Vergleich zu HUVEC und EPC der Kinder der N-Gruppe (schwarzer Pfeil a). In HUVEC und EPC beider Gruppen war MMP-2 (schwarzer Pfeil b) deutlich und in geringerem Umfang MT1-MMP (schwarzer Pfeil c) exprimiert. Die Analyse von GAPDH zeigte, dass die Menge der radioaktiv markierten cDNA in Endothelzellen der HIV-1-Gruppe [HIV-HUVEC(1) und HIV-EPC(1)] größer war (schwarzes Dreieck).

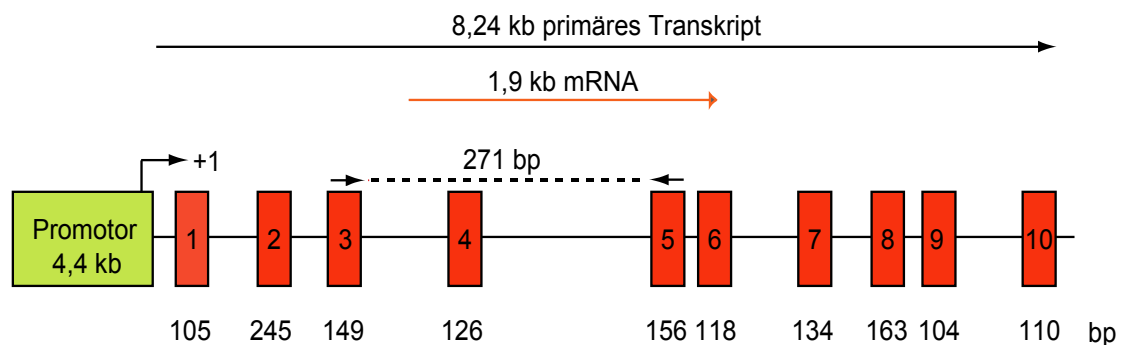
### **3.7 RT-PCR-Analyse der Expression verschiedener MMPs in HUVEC, HUAEC und EPC**

MMP-1 (Kollagenase I) spielt in der Angiogenese eine wichtige Rolle beim Abbau der extrazellulären Matrix (Brauchle *et al.*, 2000). Das MMP-1-Gen ist auf Chromosom 11 lokalisiert und besteht aus einem 4,4 kb langen Promotor (Abb. 11, grüner Block) (Rutter *et al.*, 1997), 10 Exons (Abb. 11, rote Blöcke) und 9 Introns (Abb. 11, schwarze Linien). Die Länge der Exons gibt die Zahl unter dem jeweiligen Abschnitt an, der Transkriptionsstart ist durch +1 gekennzeichnet. Das primäre Transkript von MMP-1 ist 8,24 kb, die mRNA 1,9 kb lang. Von MMP-1 sind keine Spleißvarianten bekannt. Die Primer der RT-PCR binden in Exon 3 und Exon 5 (Pfeile). Das amplifizierte Fragment war 271 bp lang (Abb. 11, gestrichelte Linie).

Auf der *Makroarray* Membran waren insgesamt 11 MMPs repräsentiert, von denen für MMP-1 (Abb. 10, schwarzer Pfeil a), MMP-2 (Abb. 10, schwarzer Pfeil b) und MT1-MMP (Abb. 10, schwarzer Pfeil c) ein Signal beobachtet wurde. Es sollte untersucht werden, ob die beobachtete Hemmung spezifisch für MMP-1 war, ob auch die anderen Proteasen betroffen waren und ob die Ergebnisse an einer größeren Zahl von Kulturen reproduzierbar waren.

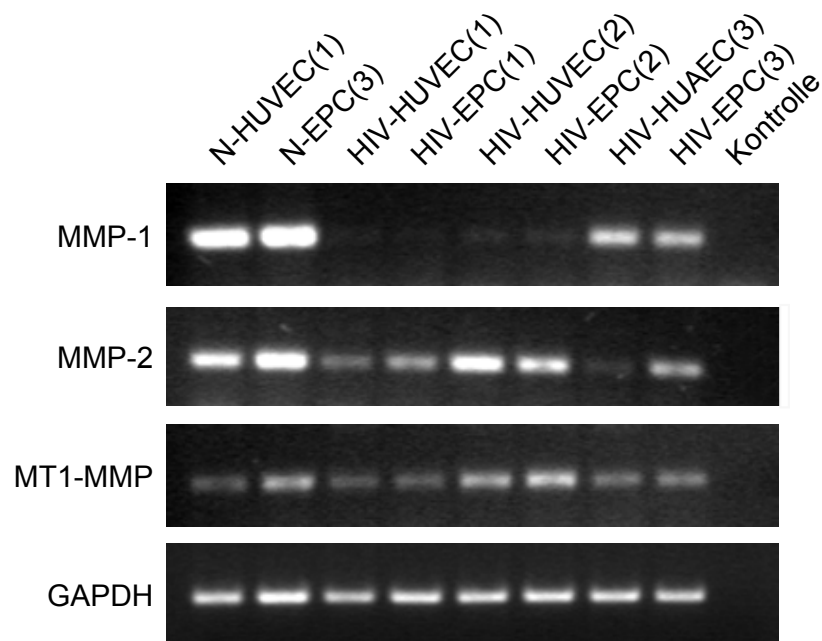
Dazu wurden die Expression von MMP-1, MMP-2 und MT1-MMP in HUVEC und EPC von drei Kindern der HIV-1-Gruppe mit der Expression dieser Proteasen in EPC und HUVEC von zwei Kindern der N-Gruppe verglichen. Die Länge des erwarteten RT-PCR-Produktes für MMP-1 war wie erwähnt 271 bp, für MMP-2 254 bp und für MT1-MMP 337 bp. Als Kontrolle gleicher RNA-Mengen wurde die konstitutiv exprimierte GAPDH-RNA nachgewiesen (Amplifikationsprodukt 474 bp).

Wie Abb. 12 zeigt, war MMP-1 in HUVEC und EPC der N-Gruppe [Abb. 12, N-HUVEC(1), N-EPC(3)] stark exprimiert. Im Gegensatz dazu war in allen Endothelzellkulturen der HIV-1-Gruppe die Menge der transkribierten MMP-1-RNA [Abb. 12, HIV-HUVEC(1, 2), HIV-HUAEC (3), HIV-EPC(1, 2, 3)] deutlich reduziert. HUVEC und EPC desselben Donors unterschieden sich nicht in der Expression von MMP-1. Die bei der Hybridisierung der *Makroarray* Membran beobachtete stärkere Expression von MMP-1 in differenzierten Endothelzellen verglichen mit EPC konnte mittels RT-PCR nicht bestätigt werden [Abb. 12, vergleiche HIV-HUAEC (3) und HIV-EPC(3) sowie N-HUVEC(1) und N-EPC(3)]. MMP-2 und MT1-MMP konnte in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden. Bei diesen Faktoren konnte im Unterschied zu MMP-1 jedoch keine Korrelation mit der HIV-1-Infektion der Mutter beobachtet werden (Abb. 12). GAPDH-Amplifikate zeigten, dass gleiche Mengen an RNA eingesetzt wurden. Die Negativkontrolle (Abb. 12, Kontrolle) war ein Reaktionsansatz ohne RNA. Hier war keine Bande nachweisbar.



**Abb. 11: Struktureller Aufbau des MMP-1-Gens.**

Das MMP-1-Gen besteht aus einem 4,4 kb großen Promotor (grüner Block), 10 Exons (rote Blöcke) und 9 Introns (schwarze Linien). Die Zahlen unter den Abschnitten geben die Größe der einzelnen Exons an, +1 kennzeichnet den Transkriptionsstart. Das primäre Transkript umfasst 8,24 kb, die mRNA 1,9 kb. Die Primer für die RT-PCR binden in Exon 3 und Exon 5 (Pfeile). Das amplifizierte Fragment hatte eine Größe von 271 bp (gestrichelte Linie).



**Abb. 12: RT-PCR-Analyse der Expression von MMP-1, MMP-2 und MT1-MMP in HUVEC, HUAEC und EPC von Kindern der HIV-1- und der N-Gruppe.**

Aus HUVEC, HUAEC und EPC von Kindern der HIV-1- und der N-Gruppe, die für 24 Std. in EBM-Vollmedium kultiviert waren, wurde mit spezifischen Primern MMP-1 (Länge des erwarteten PCR-Produktes 271 bp), MMP-2 (254 bp), MT1-MMP (337 bp) und als Kontrolle für gleiche Mengen RNA GAPDH (474 bp) mit RT-PCR amplifiziert. Während in Zellen von Kindern der N-Gruppe MMP-1 stark exprimiert war [N-HUVEC(1), N-EPC(3)], war MMP-1 in differenzierten Endothelzellen und EPC der HIV-1-Gruppe deutlich reduziert [HIV-HUVEC(1, 2), HIV-EPC(1, 2), HIV-HUAEC(3), HIV-EPC(3)]. MMP-2 und MT1-MMP waren in allen untersuchten Zellen in variabler Stärke exprimiert. Es zeigte sich keine Korrelation hinsichtlich der HIV-1-Infektion der Mutter. Als Negativkontrolle (Kontrolle) wurde ein Reaktionsansatz ohne RNA eingesetzt.

### 3.8 Nachweis der differentiellen MMP-1-Expression auf Proteinebene

Da MMP-1 bei HUVEC und EPC der HIV-1- und N-Gruppe auf RNA-Ebene differentiell exprimiert war, sollte nun untersucht werden, ob dieses Ergebnis auf Proteinebene bestätigt werden konnte.

#### 3.8.1 Western Blot-Analyse zum Nachweis der MMP-1-Expression

Die Expression von MMP-1 auf RNA- und Proteinebene kann durch angiogene Wachstumsfaktoren induziert werden (Brauchle *et al.*, 2000). Um die optimale



Induktionszeit zu bestimmen, wurde der zeitliche Verlauf der MMP-1-Expression in HUVEC der N-Gruppe nach Stimulation mit angiogenen Wachstumsfaktoren (VEGF, bFGF, jeweils 10 ng/ml) in *Low Medium* untersucht.

Die MMP-1-Expression stieg nach 16 Std. Inkubation mit angiogenen Wachstumsfaktoren an, erreichte nach 20 Std. ihren maximalen Wert und blieb bis 24 Std. auf diesem Niveau (Abb. 13A, graue Balken). Nach 48 Std. war die Menge an MMP-1 auf nahezu das ursprüngliche Maß von unstimulierten Zellen zurückgegangen (Abb. 13A). Als Auftragskontrolle gleicher Proteinmengen wurde GAPDH nachgewiesen (Abb. 13A).

Diesem Ergebnis entsprechend wurden HUVEC und EPC der HIV-1- und der N-Gruppe 20 Std. mit angiogenen Wachstumsfaktoren stimuliert und die MMP-1-Expression mittels *Western Blot*-Analyse bestimmt.

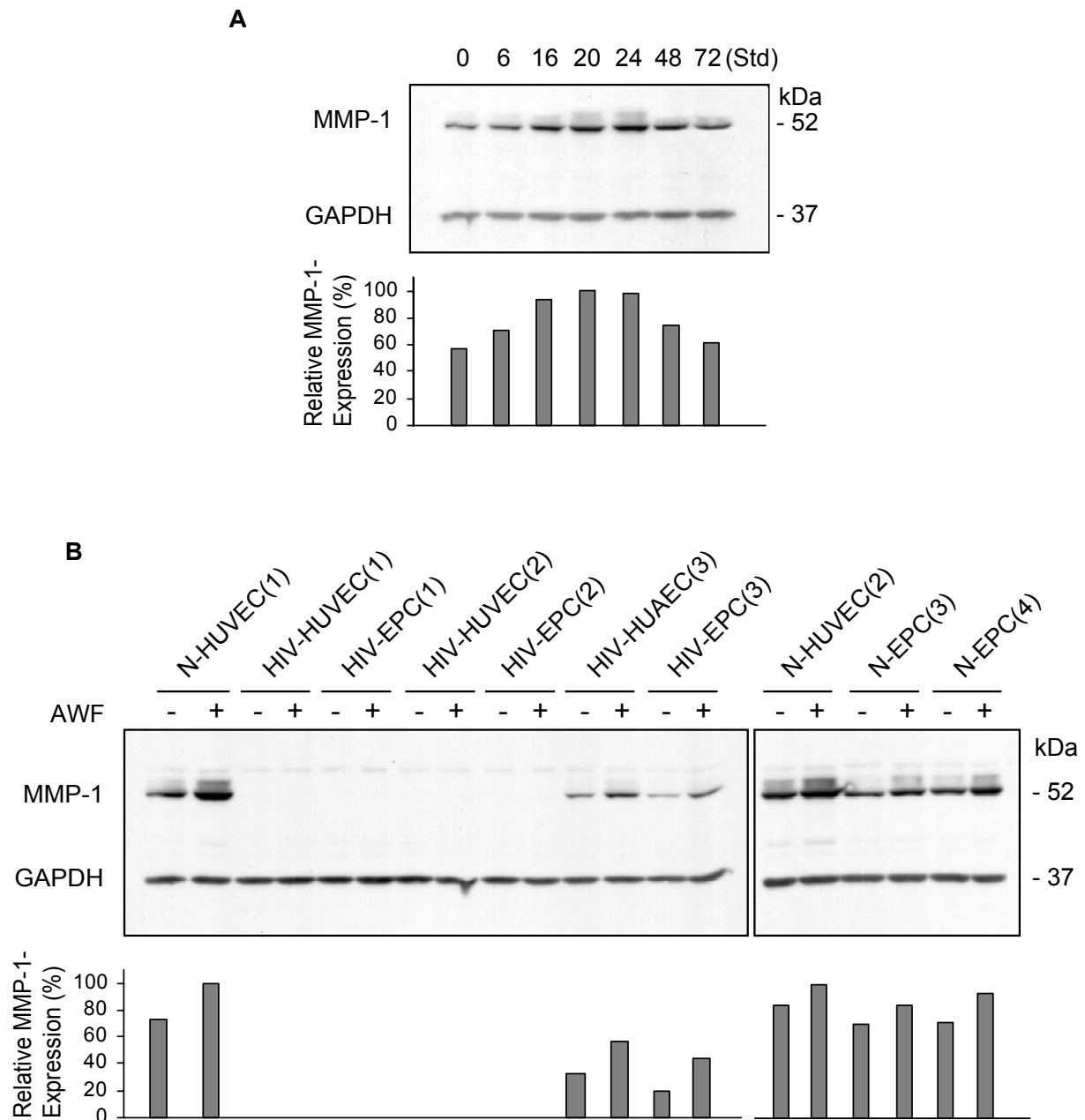
Analog zum Ergebnis der RT-PCR war die Expression von MMP-1 (graue Balken) in der HIV-1-Gruppe (3 Probanden) vollständig gehemmt beziehungsweise stark reduziert [Abb. 13B, HIV-HUVEC(1, 2), HIV-HUAEC(3), HIV-EPC(1, 2, 3)]. Im Gegensatz dazu wurde in HUVEC und EPC der N-Gruppe (4 Donoren) bereits vor Behandlung mit angiogenen Wachstumsfaktoren eine starke MMP-1-Expression beobachtet [Abb. 13B, N-HUVEC(1, 2), N-EPC(3, 4)].

Eine Steigerung der MMP-1-Expression durch angiogene Wachstumsfaktoren konnte nur in Endothelzellkulturen induziert werden, die vor Stimulation bereits MMP-1 exprimierten. Allerdings schien die Induzierbarkeit der Endothelzellkulturen zu variieren. Als Auftragskontrolle gleicher Proteinmengen wurde GAPDH nachgewiesen (Abb. 13B).

Insgesamt wurden neun Donoren der HIV-1- und neun Donoren der N-Gruppe auf MMP-1-Expression getestet (Tabelle 3.2). Es zeigte sich, dass wesentlich mehr Kulturen von Kindern der N-Gruppe im Vergleich zur HIV-1-Gruppe MMP-1 exprimierten (Tabelle 3.2). In der HIV-1-Gruppe waren von acht untersuchten EPC-Kulturen fünf negativ und drei positiv, von den drei untersuchten HUVEC-Kulturen waren zwei negativ und eine positiv, eine HUAEC-Kultur war positiv für MMP-1 (Tabelle 3.2). In der N-Gruppe wurde in fünf der sechs EPC-Kulturen MMP-1-Expression nachgewiesen, nur ein Donor war negativ (Tabelle 3.2). Die untersuchten HUVEC und EPC der N-Gruppe exprimierten sehr viel größere Mengen an MMP-1



als die positiven Endothelzellen der HIV-1-Gruppe. In HMVEC war keine MMP-1-Expression nachweisbar (Tabelle 3.2).



**Abb. 13: Nachweis der MMP-1-Expression mittels *Western Blot*-Analyse.**

(A) *Western Blot*-Analyse der MMP-1-Expression in HUVEC der N-Gruppe nach Inkubation mit angiogenen Wachstumsfaktoren (AWF). Nach 20 Stunden war die MMP-1-Expression (graue Balken) maximal. (B) *Western Blot*-Analyse zum Nachweis von MMP-1 in Proteinextrakten von HUVEC und EPC von Kindern der HIV-1- und N-Gruppe, die unbehandelt oder für 20 Stunden mit angiogenen Wachstumsfaktoren stimuliert worden waren. In HUVEC und EPC der N-Gruppe war MMP-1 bereits vor Behandlung mit angiogenen Wachstumsfaktoren stark exprimiert und konnte insbesondere bei HUVEC von Donor 1 [N-HUVEC(1)] nach Stimulation mit angiogenen Wachstumsfaktoren gesteigert werden. HUVEC, HUAEC und EPC der HIV-1-Gruppe exprimierten sowohl unstimuliert als auch nach

Stimulation MMP-1 nicht [HIV-HUVEC(1, 2), HIV-EPC(1, 2)], oder nur in deutlich reduziertem Umfang [HIV-HUAEC(3), HIV-EPC(3)]. In Zellen, die vor der Behandlung mit angiogenen Wachstumsfaktoren MMP-1 negativ waren, konnte die Expression von MMP-1 trotz Stimulation mit angiogenen Wachstumsfaktoren nicht induziert werden. Als Auftragskontrolle gleicher Proteinmengen wurde GAPDH nachgewiesen. Das Signal der jeweiligen Bande wurde densitometrisch ermittelt und auf die GAPDH-Expression standardisiert (unten). Die relative Expression von MMP-1 wurde in (A) auf den 20-Stunden-Wert und in (B) auf N-HUVEC(1) nach 20 Std. Induktion mit angiogenen Wachstumsfaktoren bezogen.

**Tabelle 3.2: MMP-1-Expression der untersuchten Zellpopulationen.**

Donor	Abstammung differenzierter Endothelzellen	MMP-1- Expression
<b>Mutter: HIV-1-positiv = HIV-Gruppe</b>		
HIV-HUVEC(1)	Vene	-
HIV-EPC(1)		-
HIV-HUVEC(2)	Vene	-
HIV-EPC(2)		-
HIV-HUAEC(3)	Arterie	+
HIV-EPC(3)		+
HIV-HUVEC(4)	Vene	+
HIV-EPC(5)		-
HIV-EPC(6)		-
HIV-EPC(7)		+
HIV-EPC(8)		+
HIV-EPC(9)		-
<b>Mutter : HIV-1-negativ = N-Gruppe</b>		
N-HUVEC(1)*	Vene	+++
N-HUVEC(2)*	Vene	+++
HMVEC*	Haut	-
N-EPC(3)		+++
N-EPC(4)		+++
N-EPC(5)		-
N-EPC(6)**		+++
N-EPC(7)**		+++
N-EPC(8)**		+++

\* Zellen kommerziell erworben

\*\* EPC zur Verfügung gestellt von R. Oostendorp und U. Keller (TU München, Klinikum rechts der Isar, III. Med. Klinik u. Poliklinik)

EPC: Endotheliale Vorläuferzellen (*Endothelial Precursor Cells*)

HUVEC: Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*)

HUAEC: Endothelzellen aus der Nabelschnurarterie (*Human Umbilical Artery Endothelial Cells*)

- keine Expression

+ geringe Expression

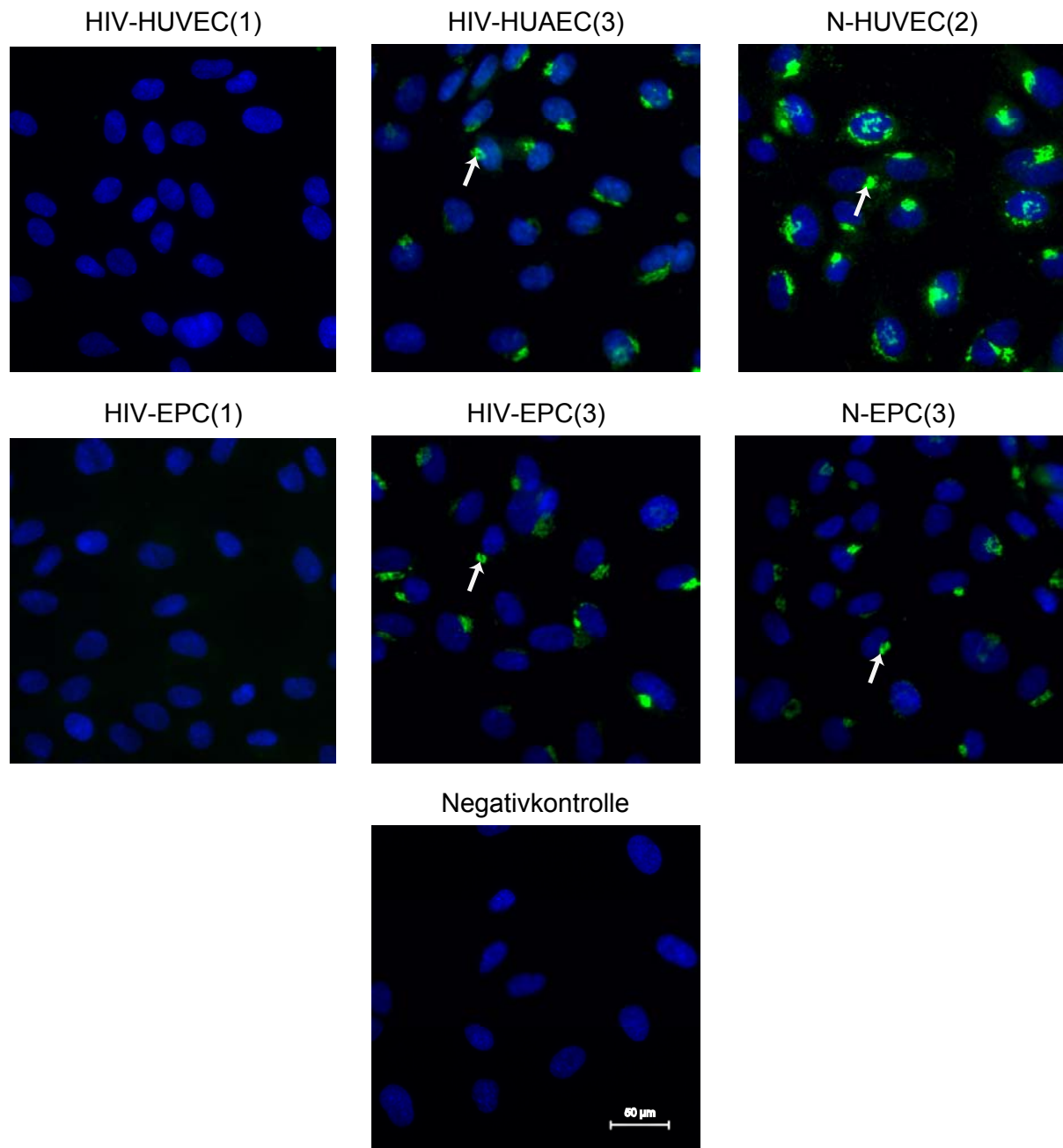
+++ starke Expression

### **3.8.2 Immunfluoreszenz-Nachweis der MMP-1-Expression auf Einzelzell-Ebene in HUVEC, HUAEC und EPC**

Ein weiterer Nachweis der differentiellen MMP-1-Expression wurde auf Einzelzell-Ebene über die immunzytochemische Färbung von HUVEC, HUAEC und EPC der HIV-1- und der N-Gruppe geführt.

Übereinstimmend mit den Daten der *Western Blot*-Analyse waren HUVEC und EPC von Donor 1 der HIV-1-Gruppe [Abb. 14, HIV-HUVEC(1), HIV-EPC(1)] negativ für MMP-1. In HUAEC und EPC von Donor 3 der HIV-1-Gruppe [Abb. 14, HIV-HUAEC(3), HIV-EPC(3)] und in EPC von Donor 3 der N-Gruppe [Abb. 14, N-EPC(3)] war MMP-1 (grüne Fluoreszenz) in der Mehrzahl der Zellen exprimiert. Im Gegensatz dazu war MMP-1 in allen Zellen in HUVEC der N-Gruppe [Abb. 14, N-HUVEC(2)] nachweisbar. MMP-1 war im perinukleären Bereich der Zellen lokalisiert (weißer Pfeil). Bei der Kontrollfärbung ohne den ersten Antikörper wurde keine Färbung beobachtet (Abb. 14, Negativkontrolle).

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz zeigten, dass MMP-1 nur in Zellkulturen, die auch in der *Western Blot*-Analyse positiv waren, nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 1: Immunfluoreszenz-Nachweis der MMP-1-Expression auf Einzelzell-Ebene in HUVEC, HUAEC und EPC.**

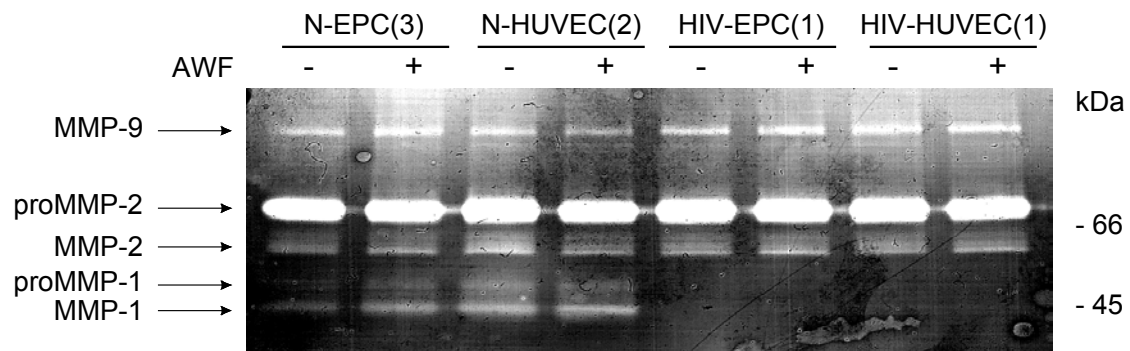
HUVEC, HUAEC und EPC von Kindern der HIV-1- und der N-Gruppe wurden in Vollmedium auf Kollagen I kultiviert. Analog zur *Western Blot*-Analyse waren HUVEC und EPC von Donor 1 der HIV-1-Gruppe [HIV-HUVEC(1), HIV-EPC(1)] für MMP-1 negativ. In HUAEC und EPC von Donor 3 der HIV-1-Gruppe [HIV-HUAEC(3), HIV-EPC(3)] sowie in EPC der N-Gruppe [N-EPC(3)] konnte MMP-1 (grüne Fluoreszenz, Pfeil) in der Mehrzahl der Zellen, in HUVEC der N-Gruppe [N-HUVEC(2)] in allen Zellen nachgewiesen werden. MMP-1 war in perinukleären Bereichen der Zellen lokalisiert (weißer Pfeil). Die Negativkontrolle wurde unter identischen Bedingungen durchgeführt, ohne Inkubation mit dem ersten Antikörper (Kontrolle). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blauen Fluoreszenz). LSM-Aufnahmen, Vergrößerung 40fach.

### **3.9 Aktivitätsnachweis von MMP-1 in HUVEC und EPC der HIV-1- und der N-Gruppe mittels Zymografie**

Die Aktivität eines Enzyms ist nicht unmittelbar mit der Menge des Proteins korreliert. Selbst wenn kein Protein nachgewiesen wird, kann trotzdem eine Enzymaktivität vorhanden sein. Deshalb sollte untersucht werden, ob Endothelzellen, deren MMP-1-Expression auf RNA- und Proteinebene unter der Nachweisgrenze waren, dennoch aktives MMP-1 aufweisen. Außerdem sollte untersucht werden, ob die reduzierte Expression von MMP-1 mit einer verstärkten Aktivität anderer Proteasen wie MMP-2 oder MMP-9 einhergeht.

Mittels Gelatine-Zymografie wurden Zellkulturüberstände von HUVEC und EPC [Abb. 15, HIV-HUVEC(1), HIV-EPC(1)] von einem Donor der HIV-1-Gruppe und HUVEC und EPC von zwei Donoren der N-Gruppe [Abb. 15, N-HUVEC(2), N-EPC(3)] untersucht. In den Überständen von EPC und HUVEC der N-Gruppe [Abb. 15, N-EPC(3), N-HUVEC(2)] war von MMP-1 sowohl die zymogene Form (proMMP-1, 56 kDa) als auch die aktive Form (45 kDa) nachweisbar (Yu und Woessner, 2001). In Überständen von EPC und HUVEC der HIV-1-Gruppe [Abb. 15, HIV-EPC(1), HIV-HUVEC(1)] konnte weder vor noch nach Stimulierung mit angiogenen Wachstumsfaktoren eine MMP-1-Aktivität nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte MMP-2 und MMP-9 in allen Kulturüberständen gleichermaßen beobachtet werden (Abb. 15). MMP-2 trat sowohl als proMMP-2 als auch aktives MMP-2 auf, für MMP-9 wurde nur eine Bande nachgewiesen (Lafleur *et al.*, 2001).

Das zeigt, dass die Aktivität von MMP-1 selektiv in Endothelzellen von Donor 1 der HIV-1-Gruppe reduziert ist und diese nicht durch eine verstärkte Aktivität von MMP-2 oder MMP-9 kompensiert wird.



**Abb. 15: Gelatine-Zymografie zum Nachweis der MMP-1-Expression in HUVEC und EPC.**

In Kulturüberständen unstimulierter Zellen oder von Zellen, die 18 Stunden mit angiogenen Wachstumsfaktoren (AWF) stimuliert worden waren, wurde die MMP-1-Aktivität zymografisch bestimmt. Die Überstände von Zellen aus der N-Gruppe [(N-EPC(3), N-HUVEC(2))] wiesen MMP-1-Aktivität auf, die über den Abbau des Gelatine-Substrats (weiße Banden) nachgewiesen wurden. Dabei konnte proMMP-1 (56 kDa Bande) und aktives MMP-1 (45 kDa Bande) in EPC und HUVEC der N-Gruppe [(N-EPC(3), N-HUVEC(2))] nachgewiesen werden. Weder EPC [HIV-EPC(1)] noch HUVEC [HIV-HUVEC(1)] des untersuchten Donors der HIV-Gruppe wiesen eine MMP-1-Aktivität auf, auch nicht nach Stimulation mit angiogenen Wachstumsfaktoren. MMP-2- und MMP-9-Aktivität wurde im Überstand aller untersuchten Zellen mit ähnlicher Stärke nachgewiesen.

### 3.10 Zwischenzusammenfassung der vergleichenden Analyse differenzierter Endothelzellen und EPC von Kindern HIV-1-infizierter Mütter mit Kontrollzellen von Kindern nicht-infizierter Mütter

Differenzierte Endothelzellen und EPC von Kindern HIV-infizierter Mütter wurden mit entsprechenden Kontrollzellen von Kindern nicht-infizierter Mütter anhand charakteristischer Endothelzellmarker verglichen. So wurde die Expression einer Reihe klassischer Endothelzellmarker wie CD31, CD105, *Scavenger* Rezeptor I zur Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem acetyliertem *Low Density* Lipoprotein (Dil-Ac-LDL), ICAM-1, VCAM-1, E-Selectin und von Willebrand Factor (vWF) durch immunzytochemische Färbungen nachgewiesen (Tabelle 3.3). Ferner wurden funktionelle Marker wie die Passagierfähigkeit und die Ausbildung dreidimensionaler Kapillar-Netzwerkstrukturen in rekonstituierter Basalmatrix (Matrigel) untersucht. Unabhängig vom HIV-1-Status der Mutter, konnten keine Unterschiede in diesen Endothelzell-spezifischen Merkmalen beobachtet werden. Allerdings zeigte die vergleichende Analyse des Genexpressionsprofils mittels *Makroarray*, dass sowohl in

differenzierten Endothelzellen als auch in EPC von Kindern der HIV-1-Gruppe im Vergleich zu Zellen von Kindern der N-Gruppe die Expression von MMP-1 unter der Nachweisgrenze liegt beziehungsweise signifikant reduziert ist. Das konnte auf RNA- und Proteinebene sowie mittels Aktivitätsnachweis (Zymografie) bestätigt werden (Tabelle 3.4).

**Tabelle 3.3: Zusammenfassung der untersuchten Marker.**

	HIV-Gruppe		N-Gruppe		
	HUVEC HUAEC	EPC	HUVEC	EPC	HMVEC
Immunzytoch. Färbungen:					
<i>Scavenger</i> Rezeptor I	+	+	+	+	+
CD31 (PECAM-1)	+	+	+	+	+
CD105 (Endoglin)	+	+	+	+	+
ICAM-1	+	+	+	+	+
E-Selectin	+	+	+	+	+
VCAM-1	+	+	+	+	+
vWF	+	+	+	+	+
<b>Funktionelle</b> Marker:					
Passagierfähigkeit	22 ± 3,5 Passagen		23 ± 2,7 Passagen		9 Passagen
Kapillarbildung	+	+	+	+	nicht durchgeführt
MMP-1-Expression	- (5 von 9)		+ (7 von 8)		-

Tabelle 3.4: Anzahl der getesteten Donoren hinsichtlich der MMP-1-Expression.

	HIV-1-Gruppe		N-Gruppe	
	HUVEC HUAEC	EPC	HUVEC	EPC
<b>RNA-Ebene</b> Makroarray, RT-PCR	3	3	2	1
<b>Proteine-Ebene</b> <i>Western Blot</i> -Analyse, Immunzytochem. Färbung	4	8	2	6
<b>Aktivitätsebene</b> Zymografie	1	1	1	1

### 3.11 Sequenzanalyse des MMP-1-Promotors in HUVEC von Kindern der HIV-1- und der N-Gruppe

Die Ursache für die fehlende oder reduzierte MMP-1-Expression in Endothelzellen von Kindern der HIV-1-Gruppe könnte in einer Mutation des Promotors liegen. Deshalb wurde die Sequenz des proximalen Promotorbereichs des MMP-1-Gens von HUVEC der HIV-1- [HIV-HUVEC(1, 2)] und der N-Gruppe [N-HUVEC(2)] bestimmt (Sanger *et al.*, 1977).

Die genomische DNA dieser Zellen wurde isoliert und ein 637 Basenpaar (bp) -Fragment mittels PCR amplifiziert und direkt sequenziert. Das amplifizierte Fragment umfasst einen Bereich von der Position -361 bis +276 um den Transkriptionsstart des MMP-1-Gens (Abb. 16, Genbank Accessionnummer: NT 033899). Das Fragment enthält den proximalen Promotor (-335 bis +125 nt; Abb. 16, schwarz unterstrichen), ein Teil des Primärtranskripts (+1 bis +277 nt; Abb. 16, blau unterstrichen), das erste Exon (+71 bis +175 nt; Abb. 16, rot unterstrichen) und einen Teil des ersten Introns (+176 bis +277 nt; Abb. 16). Der Promotor enthält eine TATA-Box, die bei -27 bis -20 nt stromaufwärts des Transkriptionsstartes +1 lokalisiert ist (Abb. 16) und drei Konsensusbindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Zwei dieser Sequenzen binden den Transkriptionsfaktor *Activator Protein-1* (AP-1) (Rutter *et al.*,

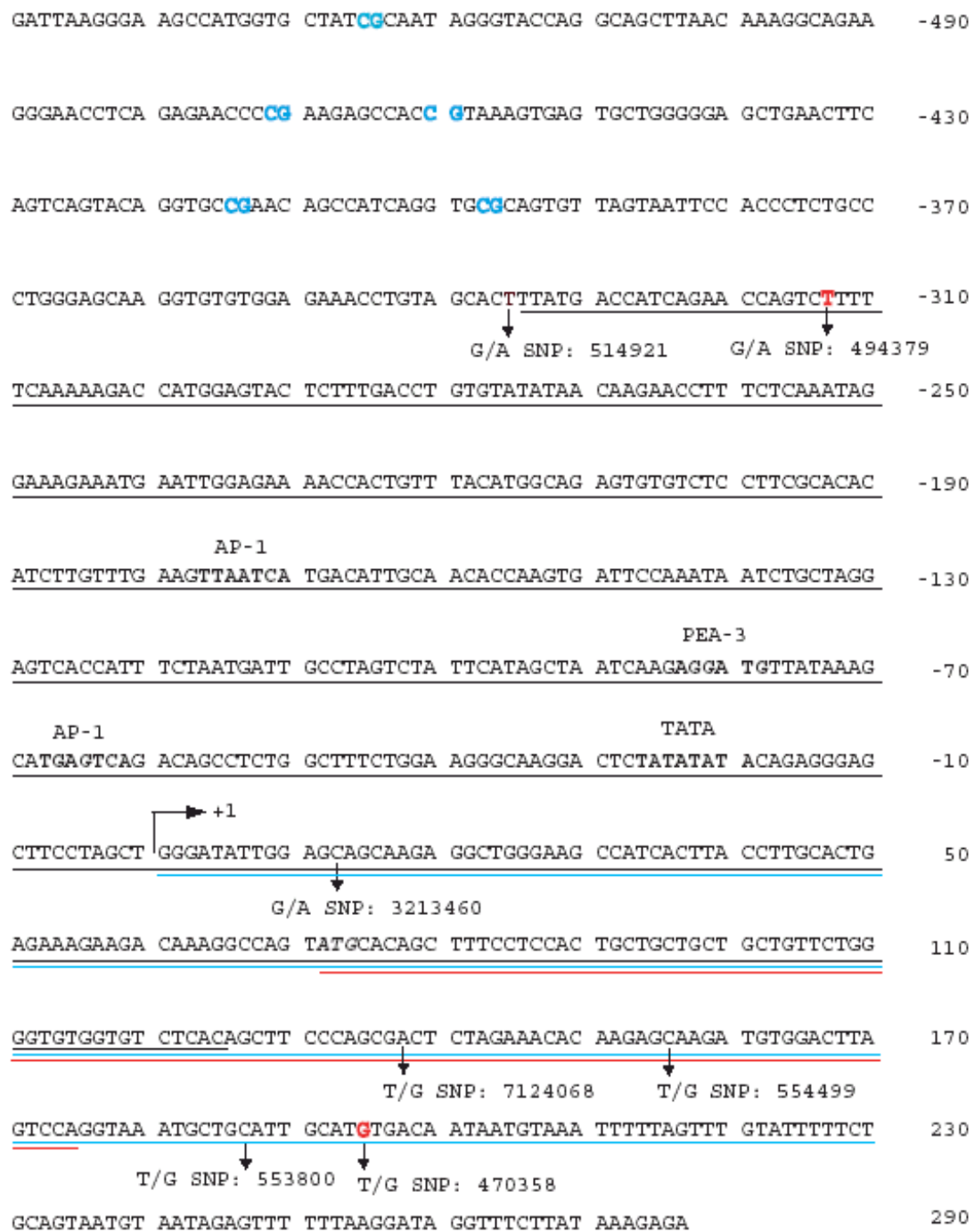


1997; Westermarck und Kahari, 1999). Die distale AP-1-Bindungsstelle ist von -177 bis -171 nt lokalisiert, die proximale liegt bei -68 bis -62 nt (Abb. 16). Letztere ist ein Hauptelement zur Regulation von MMP-1, wie Mutationsanalysen zeigten (Westermarck *et al.*, 1997). Mutationen in diesem Bereich reduzieren sowohl die basale Expression als auch die Stimulierbarkeit. An die dritte Konsensusbindungsstelle, die zwischen -84 und -79 nt lokalisiert ist, bindet der Transkriptionsfaktor *Polyoma Enhancer A Binding Protein 3* (PEA-3, Abb. 16). Für die Induktion des MMP-1-Promotors durch bFGF sind die proximale AP-1- und die PEA-3-Bindungsstellen essentiell (Newberry *et al.*, 1997). In dem isolierten Bereich wurden sieben *Single Nucleotide*-Polymorphismen (SNP) beschrieben (Genbank Accessionnummer: ss685148, ss664205, ss4474118, ss10690744, ss725488, ss724776, ss724767), die zwischen Position -336 und +195 lokalisiert sind (Abb. 16).

Die analysierten Sequenzen von HIV-HUVEC(2) und N-HUVEC(2) entsprachen der publizierten Sequenz (Abb. 16, Genbank Accessionnummer: NT 033899). Die aus HIV-HUVEC(1) isolierte Sequenz wies zwei SNPs auf: SNP 494379 und SNP 470358 (Abb. 16; rot markiert). Nachdem jedoch in HIV-HUVEC(2) diese SNPs nicht vorhanden waren, können diese Polymorphismen nicht die Ursache für die reprimierte MMP-1-Expression sein.

Da bekannt ist, dass epigenetische Effekte wie die Methylierung von CpG-Inseln eng mit der Repression von Genen assoziiert ist (Bird, 2002; Chicoine *et al.*, 2002), wurde außerdem das Methylierungsmuster von fünf CpG-Dinukleotiden im 5'-Bereich des proximalen Promotors (Abb. 16, -526 bis -525 nt, -472 bis -471 nt, -461 bis -460 nt, -415 bis -414 nt, -398 bis -397 nt) nach der Bisulfit-Methode (Frommer *et al.*, 1992) untersucht.

Unabhängig von der Expression des MMP-1-Gens, waren die sequenzierten CpG-Dinukleotide in der Region von -536 und -397 nt bei allen untersuchten HUVEC [HIV-HUVEC(1, 2), N-HUVEC(2)] methyliert (Abb. 16).



**Abb. 16: Sequenzanalyse des MMP-1-Promotors.**

Aus der genomischen DNA von HIV-HUVEC(1, 2) und N-HUVEC(2) wurde mittels PCR ein Fragment des MMP-1-Gens isoliert, das den proximalen Promotor (-335 bis 125 nt, schwarz unterstrichen), ein Teil des Primärtranskripts (+1 bis +277 nt, blau unterstrichen), das erste Exon (+71 bis +175 nt, rot unterstrichen) und einen Teil des ersten Introns (+176 bis +277 nt) enthält. Der Promotor beinhaltet eine TATA-Box und drei Konsensusbindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1 und PEA-3. Außerdem sind in dem sequenzierten Bereich sieben *Single Nucleotide*-Polymorphismen (SNP)

bekannt. Die Sequenzanalyse des proximalen MMP-1-Promotors in HUVEC von Kindern der HIV-1-[HIV-HUVEC(1, 2)] und der N-Gruppe [N-HUVEC(2)] entsprach der dargestellten Sequenz, HIV-HUVEC(1) zeigte zwei SNPs: SNP 494379 und 470358 (rot markiert). Im 5'-Bereich des proximalen Promotors sind fünf CpG-Dinukleotide (blau), die bei allen untersuchten HUVEC methyliert waren.

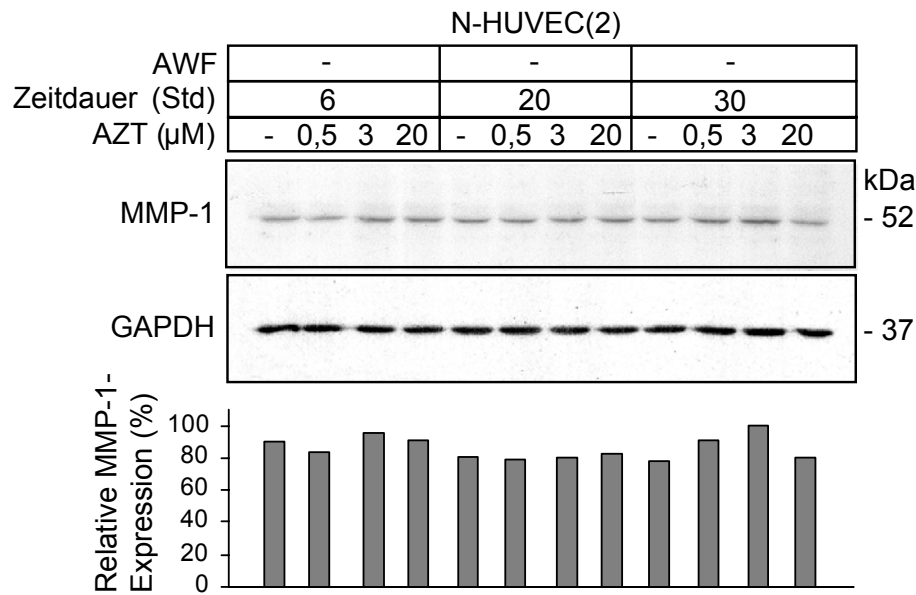
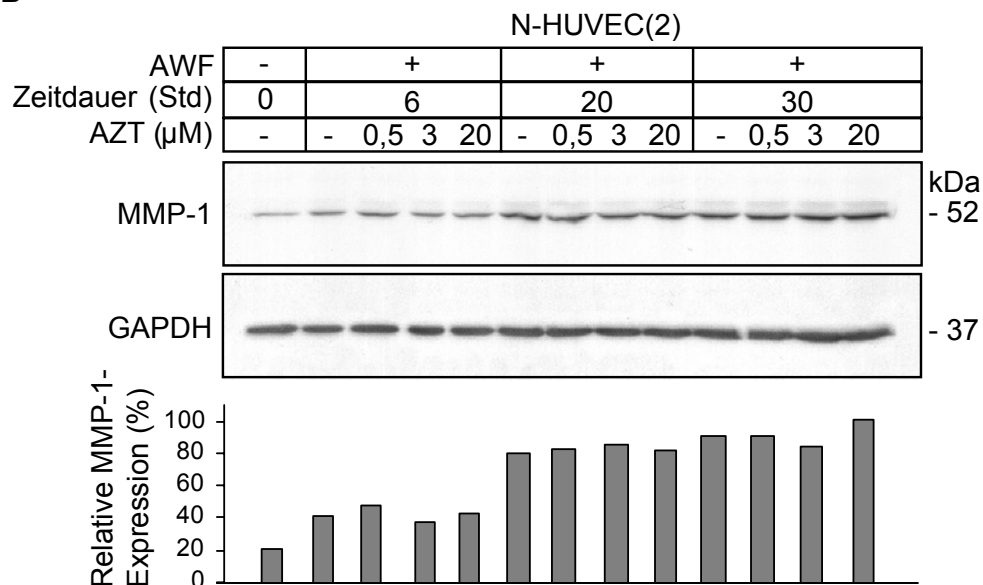
### **3.12 Azidothymidin hat keinen Einfluss auf die MMP-1-Expression**

Das Risiko der vertikalen Mutter-zu-Kind-Transmission von HIV-1 wird durch die Behandlung mit Azidothymidin (AZT) während der Schwangerschaft stark reduziert (Cohen, 1999; Lallemand *et al.*, 2000; Wade *et al.*, 1998).

Um zu untersuchen, ob AZT einen Einfluss auf die MMP-1-Expression hat, wurden HUVEC der N-Gruppe mit unterschiedlichen Konzentrationen AZT (0,5; 3 und 20  $\mu$ M) für 6, 20 und 30 Std., mit oder ohne angiogene Wachstumsfaktoren behandelt (Abb. 17). Die verwendeten AZT-Konzentrationen entsprachen den gemessenen Serum-Werten 0,5 bis 3,0  $\mu$ M von Patienten (persönliche Mitteilung des behandelnden Arztes), beziehungsweise überstiegen sie (20  $\mu$ M).

Zellen, die ohne angiogene Wachstumsfaktoren inkubiert worden waren, zeigten eine schwache MMP-1-Expression, die durch Inkubation mit 0,5, 3 oder 20  $\mu$ M AZT für 6, 20 und 30 Std. nicht entscheidend beeinflusst wurde (Abb. 17A, graue Balken). Als Kontrolle für den Auftrag gleicher Proteinmengen wurde GAPDH bestimmt (Abb. 17A).

Eine Behandlung mit angiogenen Wachstumsfaktoren induzierte die MMP-1-Expression (Abb. 17B, graue Balken). Im Vergleich zur Kontrolle war nach 6 Std. eine schwache, nach 20 Std. eine deutliche Induktion von MMP-1 zu sehen, die auch nach 30 Std. auf diesem Niveau blieb (Abb. 17B). In Zellen, die mit AZT behandelt worden waren, war weder die Kinetik noch die Stärke der Expression von MMP-1 entscheidend verändert (Abb. 17B). Als Kontrolle für gleiche Proteinmengen wurde GAPDH nachgewiesen (Abb. 17B).

**A****B****Abb. 17: AZT hat keinen Effekt auf die MMP-1-Expression.**

(A) *Western Blot*-Analyse zum Nachweis von MMP-1 in Proteinextrakten von HUVEC der N-Gruppe, die ohne oder mit AZT (0,5, 3 oder 20  $\mu$ M) für 6, 20 und 30 Std. behandelt wurden. Es konnte kein Einfluss auf die MMP-1-Expression (graue Balken) nachgewiesen werden. (B) MMP-1-Expression in HUVEC, die wie in (A) behandelt wurden und zudem gleichzeitig mit angiogenen Wachstumsfaktoren (AWF) inkubiert wurden. Es konnte ein leichter Anstieg der Expression von MMP-1 nach 6 und ein deutlicher Anstieg nach 20 beziehungsweise 30 Std. Behandlung mit angiogenen Wachstumsfaktoren beobachtet werden. AZT hatte keinen Effekt auf die MMP-1-Expression. Der Nachweis von GAPDH

zeigte, dass gleiche Mengen an Protein aufgetragen wurden. Das Signal der jeweiligen Bande wurde densitometrisch ermittelt und auf die GAPDH-Expression standardisiert (unten). Die relative Expression von MMP-1 wurde in (A) auf den 30-Stunden-Wert mit 3  $\mu$ M AZT und in (B) auf den 30-Stunden-Wert mit 20  $\mu$ M AZT bezogen.

### **3.13 GBP-1 vermittelt die Hemmung der MMP-1-Expression durch inflammatorische Zytokine**

Wie bereits gezeigt, induzieren angiogene Wachstumsfaktoren die Expression von MMP-1 (Abb. 13). Kürzlich wurde in unserem Labor nachgewiesen, dass die konstitutive Expression von rekombinantem GBP-1 in Endothelzellen die Expression von MMP-1 verhindert (Guenzi *et al.*, 2003). GBP-1 ist ein Aktivierungsmarker in Endothelzellen *in vitro* und *in vivo*, dessen Expression durch die inflammatorischen Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  spezifisch induziert und durch angiogene Wachstumsfaktoren inhibiert wird (Guenzi *et al.*, 2001; Lubeseder-Martellato *et al.*, 2002).

Es sollte untersucht werden, welchen Effekt inflammatorische Zytokine im Zusammenspiel mit angiogenen Wachstumsfaktoren auf die Expression von MMP-1 und GBP-1 in Endothelzellen haben.

Dazu wurde die Expression von MMP-1 und GBP-1 in HUVEC der N-Gruppe untersucht, die für 24 Std. mit IL-1 $\beta$  (200 U/ml), TNF $\alpha$  (300 U/ml) und IFN $\gamma$  (100 U/ml) vorinkubiert und danach mit angiogenen Wachstumsfaktoren (bFGF und VEGF, jeweils 10 ng/ml) für 16 Std. stimuliert wurden.

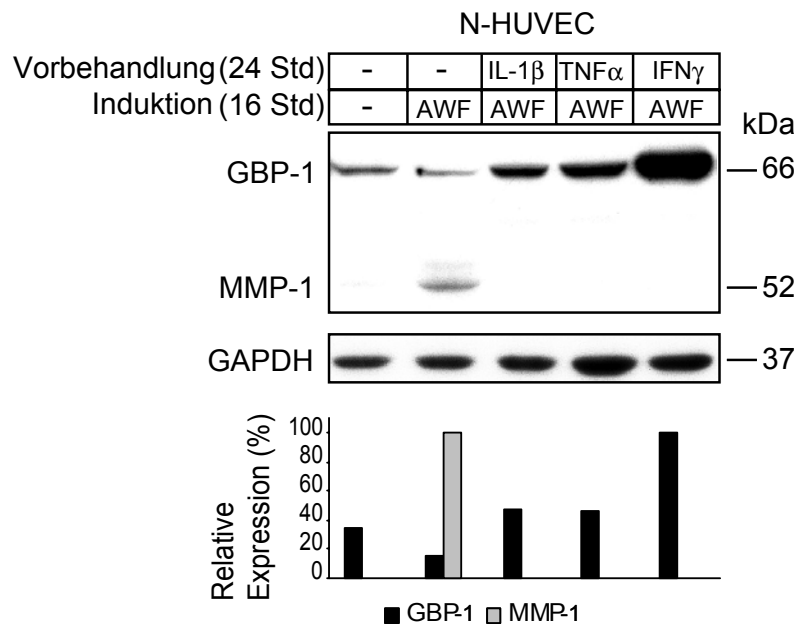
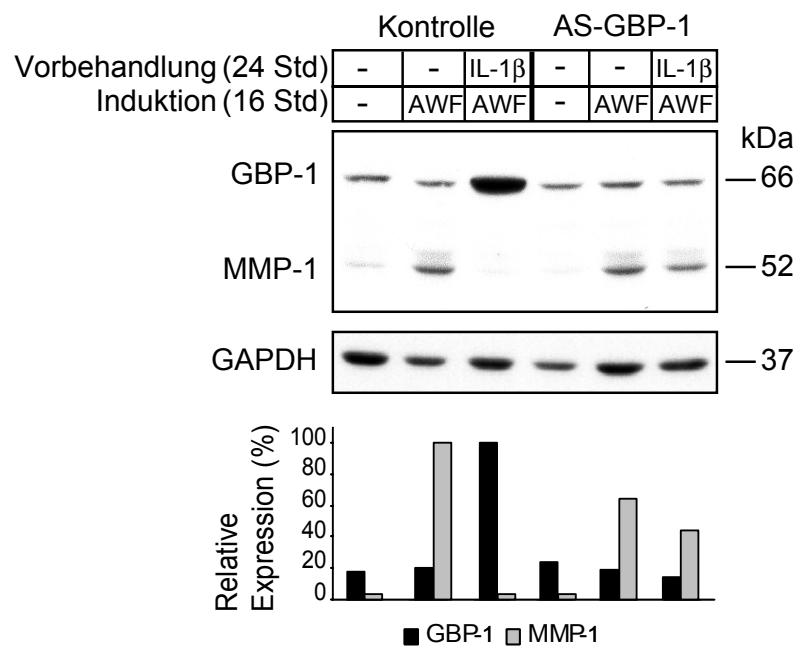
In unbehandelten Zellen war eine schwache GBP-1-Expression (Abb. 18A, schwarze Balken) zu sehen, MMP-1 konnte nicht nachgewiesen werden. In HUVEC, die für 16 Std. mit angiogenen Wachstumsfaktoren stimuliert waren, war die Expression von MMP-1 (Abb. 18A, graue Balken) induziert. Wie erwartet, exprimierten Endothelzellen, die für 24 Std. mit IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  oder IFN $\gamma$  vorinkubiert waren, verstärkt GBP-1 (Abb. 18A). In diesen Zellkulturen konnte trotz Stimulation mit angiogenen Wachstumsfaktoren die Expression von MMP-1 nicht induziert werden (Abb. 18A). Als Auftragskontrolle gleicher Proteinmengen wurde GAPDH nachgewiesen.

Inflammatorische Zytokine beeinflussen in Endothelzellen die Expression zahlreicher Gene. Deshalb sollte untersucht werden, ob die Hemmung der MMP-1-Synthese in Endothelzellen spezifisch von GBP-1 vermittelt wird. Dazu wurde das zelluläre GBP-1 durch die konstitutive Expression der *antisense*-GBP-1 mRNA (AS-GBP-1) blockiert und die Induzierbarkeit von MMP-1 untersucht.

N-HUVEC wurden mit dem retroviralen Expressionsvektor pBabe, der für *antisense*-GBP-1 kodiert, oder dem Leervektor transduziert und ohne beziehungsweise mit IL-1 $\beta$  (200 U/ml) für 24 Std. vorbehandelt. Anschließend wurde die Expression von MMP-1 mit angiogenen Wachstumsfaktoren (bFGF und VEGF, jeweils 10 ng/ml) für 16 Std. induziert.

Unstimulierte Zellkulturen, die mit *antisense*-GBP-1 (AS-GBP-1) oder dem Leervektor (Kontrolle) transduziert waren, exprimierten GBP-1 (Abb. 18B, schwarze Balken) schwach, MMP-1 war nicht nachweisbar. Nach Inkubation mit angiogenen Wachstumsfaktoren war MMP-1 (Abb. 18B, graue Balken) sowohl in *antisense*-GBP-1 exprimierenden als auch in Leervektor-transduzierten HUVEC induziert. Nach Vorinkubation mit IL-1 $\beta$  und anschließender Stimulation mit angiogenen Wachstumsfaktoren konnte in HUVEC, die mit dem Leervektor transduziert waren, eine starke GBP-1-Expression und keine MMP-1-Expression nachgewiesen werden (Abb. 18B). Im Gegensatz dazu konnte in IL-1 $\beta$ -stimulierten N-HUVEC, deren endogene GBP-1-Expression durch die *antisense*-GBP-1 mRNA gehemmt war, die Expression von MMP-1 induziert werden (Abb. 18B). Als Kontrolle für gleiche Proteinmengen wurde GAPDH bestimmt.

Diese Untersuchungen zeigten, dass die Expression von GBP-1 und MMP-1 in Endothelzellen, die mit inflammatorischen Zytokinen stimulierten wurden, invers korreliert. Darüber hinaus vermittelt GBP-1 die durch inflammatorische Zytokine induzierte Hemmung der MMP-1-Expression.

**A****B**

**Abb. 18: GBP-1 vermittelt die durch inflammatorische Zytokine induzierte Hemmung der MMP-1-Expression.**

(A) HUVEC der N-Gruppe wurden ohne oder mit IL-1 $\beta$  (200 U/ml), TNF $\alpha$  (300 U/ml) oder IFN $\gamma$  (100 U/ml) für 24 Std. vorinkubiert und danach für 16 Std. mit angiogenen Wachstumsfaktoren (AWF) stimuliert. In Zellen, in denen nach Behandlung mit inflammatorischen Zytokinen die GBP-1-Expression (schwarze Balken) induziert war, konnte MMP-1 (graue Balken) durch angiogene Wachstumsfaktoren nicht induziert werden. (B) Leervektor (Kontrolle) und *antisense*-GBP-1 (AS-

GBP-1) transduzierte HUVEC wurden mit IL-1 $\beta$  (200 U/ml) vorbehandelt und nachfolgend mit angiogenen Wachstumsfaktoren (AWF) inkubiert. In *antisense*-GBP-1 transduzierten Zellen war die Stimulierung der GBP-1-Expression durch IL-1 $\beta$  gehemmt. In diesen Zellen konnte die Expression von MMP-1 durch angiogene Wachstumsfaktoren induziert werden. Im Gegensatz dazu exprimierten transduzierte Kontroll-HUVEC GBP-1, wobei in diesen Zellen die Synthese von MMP-1 durch angiogene Wachstumsfaktoren nicht induziert werden konnte. Das Signal der jeweiligen Bande wurde densitometrisch ermittelt und auf die GAPDH-Expression standardisiert (unten). Die relative Expression von GBP-1 wurde in (A) auf HUVEC, stimuliert mit IFN $\gamma$ , und in (B) auf Kontrollzellen, stimuliert mit IL-1 $\beta$ , bezogen. Der Referenzwert für die maximale MMP-1-Expression war in (B) Kontrollzellen, inkubiert mit angiogenen Wachstumsfaktoren.

### **3.14 Die reduzierte MMP-1-Expression in Endothelzellen von Kindern der HIV-1-Gruppe ist nicht in einer erhöhten GBP-1-Expression begründet**

Es sollte untersucht werden, ob die Hemmung von MMP-1 in Endothelzellen von Kindern der HIV-1-Gruppe auf eine erhöhte GBP-1-Expression zurückzuführen ist.

HUVEC, HUAEC und EPC-Langzeitkulturen der HIV-1- und der N-Gruppe wurden für 20 Std. mit angiogenen Wachstumsfaktoren (bFGF und VEGF, jeweils 10 ng/ml) stimuliert und die Expression von MMP-1 und GBP-1 analysiert. Als quantitative Kontrolle für eine verstärkte GBP-1-Synthese wurden HUVEC der N-Gruppe mit IL-1 $\beta$  (200 U/ml) für 24 Std. behandelt und die GBP-1-Expression mit unbehandelten Zellen verglichen.

In IL-1 $\beta$  stimulierten Zellen konnte eine deutliche Induktion der GBP-1-Expression (schwarze Balken) beobachtet werden, wohingegen MMP-1 (graue Balken) nicht induziert war [Abb. 19A und B, N-HUVEC(1)]. Im Gegensatz dazu war in unbehandelten Zellen MMP-1 stärker und GBP-1 schwächer exprimiert [Abb. 19A und B, N-HUVEC(1)]. Nach Stimulation mit angiogenen Wachstumsfaktoren war in N-HUVEC eine starke Induktion von MMP-1 nachweisbar, die Expression von GBP-1 war nicht induziert [Abb. 19A und B, N-HUVEC(1)]. Es konnte bestätigt werden, dass MMP-1 in HUVEC, HUAEC (Abb. 19A, HIV-HUVEC(1, 2), HIV-HUAEC(3)) und in EPC [Abb. 19B, HIV-EPC(1, 2, 3, 4, 5)] der HIV-1-Gruppe trotz Behandlung mit angiogenen Wachstumsfaktoren nicht oder nur schwach exprimiert war und dies nicht mit einer erhöhten GBP-1-Expression korrelierte. Im Gegensatz dazu war in EPC-Langzeitkulturen der N-Gruppe [Abb. 19B, N-EPC(3, 4, 6, 7, 8)] MMP-1 deutlich



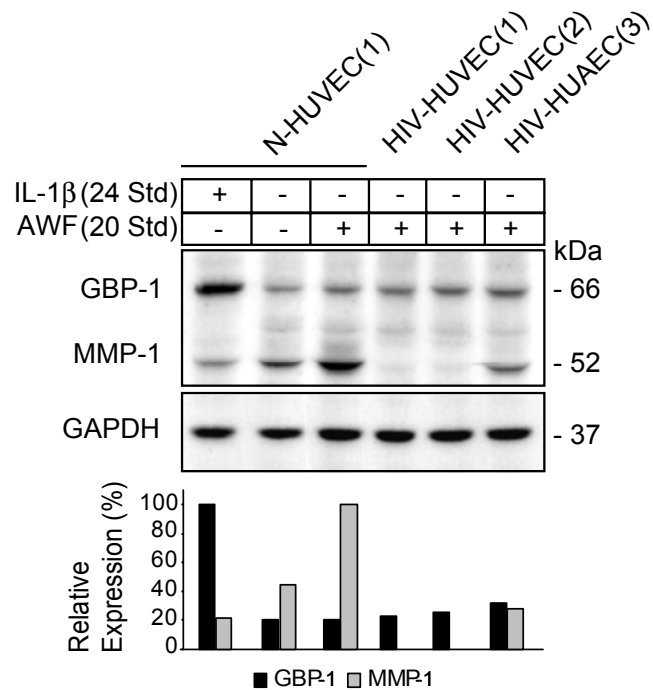
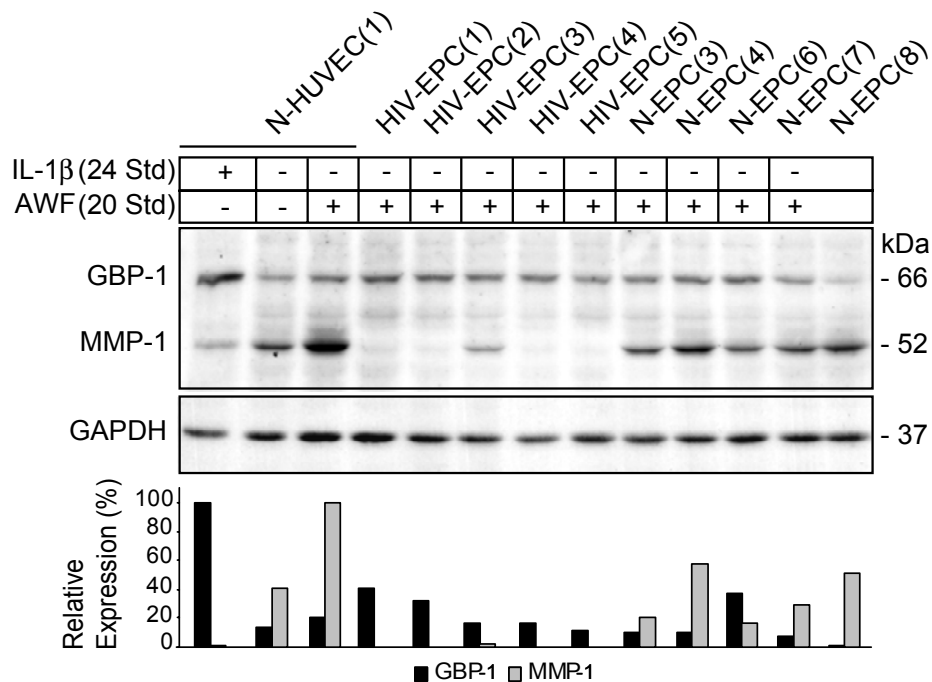
stärker nachweisbar, jedoch in einem schwächeren Umfang als in differenzierten Endothelzellen der N-Gruppe [Abb. 19B, N-HUVEC(1)]. Die exprimierte Menge an GBP-1 war in allen Zellarten gleich. GAPDH wurde als Nachweis für gleiche Proteinmengen aufgetragen (Abb. 19A und B).

Es konnte bestätigt werden, dass Endothelzellen der N-Gruppe im Vergleich zur HIV-1-Gruppe deutlich mehr MMP-1 exprimieren. Allerdings korrelierte in der HIV-1-Gruppe die Hemmung der MMP-1-Expression nicht mit einer erhöhten Menge an GBP-1.

Es sollte untersucht, ob die Expression von GBP-1 in Endothelzellen von Kindern der HIV-1-Gruppe durch inflammatorische Zytokine induziert werden kann. Dazu wurden HUVEC und EPC von Donor 1 der HIV-1-Gruppe [HIV-HUVEC(1), HIV-EPC(1)] ohne oder mit IL-1 $\beta$  (200 U/ml), TNF $\alpha$  (300 U/ml) und IFN $\gamma$  (100 U/ml) für 24 Std. stimuliert. Als Kontrolle wurden N-HUVEC [N-HUVEC(1)] mit inflammatorischen Zytokinen behandelt.

Die Expression von GBP-1 (Abb. 20, graue Balken) war in allen getesteten Kulturen [HIV-HUVEC(1), HIV-EPC(1) und N-HUVEC(1)] nach Stimulation mit inflammatorischen Zytokinen, insbesondere nach Inkubation mit IFN $\gamma$ , stark erhöht (Abb. 20). Allerdings war GBP-1 bereits in unbehandelten Zellen der EPC-Kultur von Donor 1 der HIV-1-Gruppe [Abb. 20, HIV-EPC(1)] deutlich nachweisbar. Als Kontrolle für gleiche Proteinmengen wurde GAPDH nachgewiesen (Abb. 20).

Die Expression von GBP-1 konnte durch inflammatorische Zytokine sowohl in Endothelzellen von Donor 1 der HIV-1- als auch der N-Gruppe induziert werden (Abb. 20).

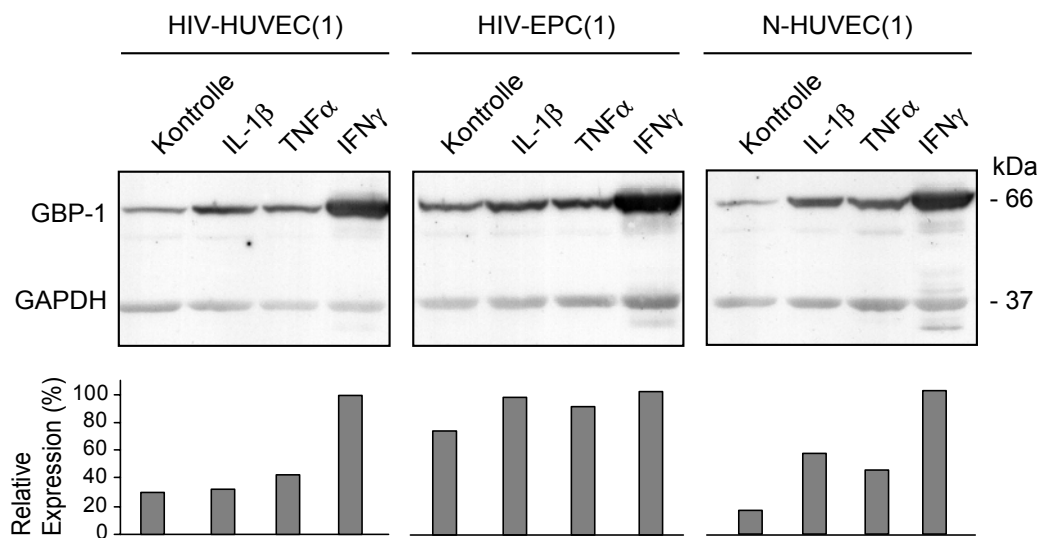
**A****B**

**Abb. 19: Die gehemmte MMP-1-Expression in Endothelzellen der HIV-1-Gruppe ist nicht auf eine erhöhte GBP-1-Expression zurückzuführen.**

Western Blot-Analyse zum Nachweis der MMP-1- und GBP-1-Expression in HUVEC, HUAEC (A) und EPC-Langzeitkulturen (B) der HIV-1- sowie der N-Gruppe. HUVEC der N-Gruppe wurden entweder unbehandelt, mit IL-1 $\beta$  (200 U/ml) für 24 Std. oder mit angiogenen Wachstumsfaktoren (AWF) für 20 Std. stimuliert. Alle anderen Endothelzellkulturen wurden mit angiogenen Wachstumsfaktoren für 20 Std. behandelt. In N-HUVEC, die mit IL-1 $\beta$  stimuliert worden waren, war die Expression von GBP-1

(schwarze Balken) stark erhöht, wohingegen die Expression von MMP-1 (graue Balken) nicht induziert war. In unbehandelten Zellen war GBP-1 und MMP-1 schwach exprimiert. Im Gegensatz dazu war in N-HUVEC, die mit angiogenen Wachstumsfaktoren stimuliert worden waren, eine starke MMP-1-Expression nachweisbar, GBP-1 war nicht induziert.

(A) MMP-1 war in HUVEC und HUAEC der HIV-1-Gruppe verglichen zu HUVEC der N-Gruppe nicht oder nur schwach exprimiert. Dies korrelierte nicht mit einer erhöhten GBP-1-Expression [HIV-HUVEC(1, 2), HIV-HUAEC(3)]. (B) Auch in EPC-Langzeitkulturen der HIV-1-Gruppe [HIV-EPC(1, 2, 3, 4, 5)] war MMP-1 nicht oder nur schwach exprimiert, was nicht auf eine erhöhte GBP-1-Expression zurückgeführt werden konnte. Wie bereits gezeigt, wurde eine deutliche Expression von MMP-1 in EPC-Langzeitkulturen der N-Gruppe [N-EPC(3, 4, 6, 7, 8)] beobachtet, die jedoch geringer war als in differenzierten Endothelzellen der N-Gruppe [N-HUVEC(1)]. GAPDH wurde als Nachweis für gleiche Proteinmengen aufgetragen (A und B). Das Signal der jeweiligen Bande wurde densitometrisch ermittelt und auf die GAPDH-Expression standardisiert (unten). Die relative Expression von MMP-1 wurde in (A) und (B) auf N-HUVEC(1), stimuliert mit angiogenen Wachstumsfaktoren, und von GBP-1 auf N-HUVEC(1), inkubiert mit IL-1 $\beta$ , bezogen.



**Abb. 20: Nachweis der Induzierbarkeit von GBP-1 in Endothelzellen.**

Endothelzellen der HIV-1- [HIV-HUVEC(1), HIV-EPC(1)] und der N-Gruppe [N-HUVEC(1)] wurden ohne (Kontrolle) oder mit IL-1 $\beta$  (200 U/ml), TNF $\alpha$  (300 U/ml) oder IFN $\gamma$  (100U/ml) für 24 Std. inkubiert. Eine Induktion der GBP-1-Expression konnte nach Stimulation mit inflammatorischen Zytokinen in allen untersuchten Kulturen nachgewiesen werden. GAPDH wurde als Nachweis für gleiche Mengen an Protein aufgetragen. Das Signal der jeweiligen Bande wurde densitometrisch ermittelt und auf die GAPDH-Expression standardisiert (unten). Die relative Expression von GBP-1 wurde auf N-HUVEC(1), stimuliert mit IFN $\gamma$ , bezogen.

## 4 Diskussion

Bei HIV-1-infizierten Patienten treten häufig Herz-Kreislaufkrankungen auf, die mit Gefäßveränderungen assoziiert sind (Passalaris *et al.*, 2000; Zietz *et al.*, 1996). Bereits vor Einführung von HAART wurden bei HIV-1-infizierten Patienten ausgedehnte arteriosklerotische Veränderungen der Koronargefäße beobachtet (Neumann *et al.*, 2002), die auf den direkten Einfluss von HIV-1 oder auf opportunistische Infektionen infolge der Immunschwäche zurückgeführt wird (Neumann *et al.*, 2002). Auffällig ist, dass bereits bei nicht-infizierten Kindern HIV-1-positiver Mütter eine signifikant schlechtere Funktion des Herzens auftritt (Lipshultz *et al.*, 2002).

Die Daten der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass die maternale HIV-1-Infektion die Genexpression der Endothelzellen und der EPC des Neugeborenen beeinflusst.

### 4.1 Isolierung und Kultivierung von EPC aus dem Nabelschnurblut sowie von differenzierten Endothelzellen aus der Nabelschnurvene und -arterie

Zur Behandlung von Ischämien (Minderdurchblutung eines Organs oder Gewebes) oder Infarkten (Unterbrechung der Durchblutung) sind EPC im Sinne der therapeutischen Neovaskularisierung in den letzten Jahren zunehmend in das Zentrum des medizinischen Interesses gerückt. Insbesondere da erste Experimente an Mäusen mit einseitiger Ischämie des Hinterlaufs zeigten, dass die Transplantation von *ex vivo* expandierten humanen EPC aus Nabelschnurblut die Neubildung von Blutgefäßen unterstützt und somit ein milderer Krankheitsverlauf beobachtet wurde (Kalka *et al.*, 2000a).

Dabei ist die Handhabung dieser Stamm- und Vorläuferzellen nach wie vor keine Standardmethode. Ein Problem bei der Isolierung und Kultivierung von EPC stellen die geringen Mengen des verfügbaren Nabelschnurbluts, der niedrige Anteil dieser Zellen und große Unterschiede von Spender zu Spender dar.

In dieser Arbeit wurde zunächst die Isolierung und Kultivierung der EPC aus Nabelschnurblut etabliert. Hierzu wurden EPC mit Hilfe von CD34<sup>+</sup>-Antikörper-konjugierten Magnetpartikeln aus dem Nabelschnurblut isoliert (Asahara *et al.*, 1997; Peichev *et al.*, 2000). Andere beschriebene Methoden erschienen weniger geeignet. So waren zum Beispiel bei der Kultivierung der gesamten mononukleären Zellfraktion

des Nabelschnurbluts (Vasa *et al.*, 2001) Kontaminationen mit anderen Zellen wie Fibroblasten zu erwarten gewesen. Eine weitere Möglichkeit ist die Isolation mit dem vorwiegend auf hämatopoetischen Stammzellen vorkommende Oberflächenantigen CD133. Allerdings wird diese Methode bevorzugt, wenn als Ausgangsmaterial Knochenmark oder Blut verwendet wird, das durch medikamentöse Stimulation des Knochenmarks mit CD133<sup>+</sup>-Zellen angereichert ist (Gehling *et al.*, 2000).

Mit der angewandten Methode kann eine Kontamination mit zirkulierenden, differenzierten Endothelzellen, die ebenfalls das CD34-Antigen exprimieren, nicht ausgeschlossen werden. Dafür, dass tatsächlich EPC isoliert wurden sprachen jedoch zwei Kriterien: Die langsamere Absetzgeschwindigkeit und die unterschiedliche Morphologie der Zellen in den ersten Tagen nach Isolierung. Nur ein geringer Teil der isolierten Zellpopulation adhärierte und sedimentierte innerhalb der ersten Tage als kleine runde Zellen. Erst nach fünf bis sechs Tagen wurden wachsende Zellhaufen mit der typischen „Pflasterstein“-artigen Morphologie von Endothelzellen beobachtet. Ein konfluenter Zellrasen bildete sich durchschnittlich nach drei Wochen. Im Gegensatz dazu adhärierten HUVEC und HUAEC unmittelbar nach der Isolierung und zeigten innerhalb weniger Stunden die Endothelzell-spezifische Morphologie. Aufgrund der geringen verfügbaren Mengen an Nabelschnurblut (zwischen 4 und 15 ml), konnte weder der Prozentsatz der CD34<sup>+</sup>-Zellen, noch die Koexpression von CD34 mit weiteren Endothelzellmarkern im Ausgangsmaterial mittels FACS ermittelt werden. Um die geringen Zellzahlen zu kompensieren, wurden die isolierten Zellen expandiert und Langzeitkulturen angelegt. Für die Expansion der Zellen wurden verschiedene Parameter getestet, wobei die Kultivierung in EBM mit 10% fötalem Kalbserum und 10% Pferdeserum in Kombination mit Stammzell-Wachstumsfaktor und der Beschichtung des Kulturgefäßes mit Fibronectin am erfolgreichsten war. Bemerkenswert war, dass nur aus Nabelschnurblut EPC-Langzeitkulturen angelegt werden konnten. Aus dem Blut adulter Probanden konnten mit der beschriebenen Methode zwar Zellen in Kultur gehalten werden, jedoch nicht expandiert werden. Der Grund hierfür könnte ein höheres Wachstumspotential der neonatalen Stammzellen sein oder ein quantitativer Effekt, da im Nabelschnurblut die Zahl der CD34<sup>+</sup>-Zellen um den Faktor 10 höher ist als im Blut Erwachsener (Murohara *et al.*, 2000). Das ist deshalb interessant, da im Gegensatz zu dieser Arbeit einige Arbeitsgruppen EPC als die Zellen definieren, die nach einem kurzen Zeitraum von drei bis vier Tagen adhärieren und eine rundliche

bis spindelförmige Morphologie aufweisen (Asahara *et al.*, 1997; Kalka *et al.*, 2000a; Vasa *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit Zellen gearbeitet, die die charakteristische polygonale „Pflasterstein“-artige Morphologie von Endothelzellen hatten und als Langzeitkulturen expandiert werden konnten. Alle isolierten Kulturen wiesen eine homogene Morphologie auf (Abb. 4). Die beobachtete Homogenität der isolierten und kultivierten Zellen weist darauf hin, dass Endothelzellen isoliert wurden. Kontaminationen mit Zellen anderer Morphologie wurde nicht beobachtet. Dies ist von Bedeutung, da neuere Veröffentlichungen belegen, dass im Nabelschnurblut neben hämatopoetischen auch mesenchymale Stammzellen mit fibroblasten-ähnlicher Morphologie zirkulieren (Erices *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003). Unter spezifischen Kultivierungsbedingungen differenzieren mesenchymale Stammzellen aus dem Nabelschnurblut *in vitro* zu Knochen- und Knorpelzellen, die die typischen Zellmarker und die charakteristische Morphologie der jeweiligen Zellart aufweisen (Lee *et al.*, 2003). Aufgrund der Morphologie und durch Unterscheidung der untersuchten Marker wie vWF oder E-Selektin können sie jedoch von Endothelzellen differenziert werden.

Hinsichtlich der Isolierung und Adhäsion wurde kein quantitativer Unterschied in der Anzahl der isolierten EPC in Relation zur Menge des Nabelschnurblutes zwischen Donoren der HIV-1- und der N-Gruppe beobachtet. Darüber hinaus war auch die Morphologie der isolierten EPC von der maternalen HIV-1-Infektion nicht beeinflusst.

Differenzierte Endothelzellen adhärten unmittelbar nach der Isolierung und wiesen anders als EPC binnen einiger Stunden die charakteristische „Pflasterstein“-artige Morphologie von Endothelzellen auf. Dabei traten keine Unterschiede zwischen HUVEC und HUAEC auf. Bemerkenswert war, dass auch in diesen Kulturen keine Kontaminationen mit Zellen anderer Morphologie wie Fibroblasten beobachtet wurden. Da nur differenzierte Endothelzellen von Kindern HIV-1-infizierter Mütter isoliert wurden, kann keine Aussage über eventuelle Unterschiede zu HUVEC von Kindern nicht-infizierter Mütter gemacht werden. Letztere wurden kommerziell erworben.

#### **4.2 HUVEC, HUAEC und EPC von Kindern der HIV-1- und der N-Gruppe unterscheiden sich nicht hinsichtlich funktioneller Kriterien und charakteristischer Marker**

Die isolierten HUVEC, HUAEC und EPC sowie HMVEC wurden anhand der konstitutiv exprimierten Endothelzell-spezifischen Marker CD31, CD105 und den *Scavenger* Rezeptor I zur Aufnahme von Ac-LDL charakterisiert. Die Expression von CD31 ist charakteristisch für Endothelzellen, wird aber auch von T-Zellen, Monozyten und neutrophilen Leukozyten synthetisiert (Watt *et al.*, 1995). CD105 kann auf Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, hämatopoetischen Vorläuferzellen und in Blutgefäßen wachsender Tumoren nachgewiesen werden (Burrows *et al.*, 1995; Garlanda und Dejana, 1997; Rokhlin *et al.*, 1995). Der *Scavenger* Rezeptor I zur Aufnahme von Ac-LDL wird von Endothelzellen aber auch von Makrophagen, Monozyten, Fibroblasten, Glattmuskelzellen und Perizyten exprimiert (Garlanda und Dejana, 1997; Goldstein *et al.*, 1979; Voyta *et al.*, 1984). Alle isolierten Zellen der HIV-1- und der N-Gruppe exprimierten diese Marker. Auch wenn die einzelnen Marker für sich keine hundertprozentige Aussagekraft haben, so deutet die Tatsache, dass alle Marker in den isolierten Zellen nachweisbar waren darauf hin, dass mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit Endothelzellen kultiviert wurden (Tabelle 3.3).

Wie bereits erwähnt, wurden bei HIV-1-Infizierten erhöhte Konzentrationen der inflammatorischer Zytokine nachgewiesen (Breen, 2002; Poli, 1999; Sinicco *et al.*, 1993). In Endothelzellen induzieren inflammatorische Zytokine eine verstärkte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin, was zu einer vermehrten Anlagerung von Leukozyten an das Endothel und somit zu einer chronischen Inflammation führen kann (Pober und Cotran, 1990; Pober *et al.*, 1986; Swerlick *et al.*, 1992; Zietz *et al.*, 1996). In diesem Zusammenhang war es von besonderem Interesse, ob HUVEC, HUAEC und EPC von Kindern HIV-1-infizierter Mütter Auffälligkeiten und Veränderungen hinsichtlich der Expression der induzierbaren Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin und der Freisetzung von vWF zeigten. Nicht-stimulierte Endothelzellen exprimieren kein VCAM-1 oder E-Selektin und ICAM-1 nur in geringem Umfang (Haraldsen *et al.*, 1996; Hubbard und Rothlein, 2000; Swerlick *et al.*, 1992). Nach Inkubation mit IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  konnte bei allen getesteten Zellen VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin nachgewiesen werden,

unabhängig vom HIV-1-Status der Mutter. Neben Endothelzellen wird ICAM-1 von Lymphozyten und Monozyten (Hubbard und Rothlein, 2000), VCAM-1 von Makrophagen, dendritischen Zellen und Mesothelzellen exprimiert (Garlanda und Dejana, 1997). E-Selektin wurde bisher nur bei Endothelzellen nachgewiesen (Garlanda und Dejana, 1997). vWF wird von Endothelzellen, Thrombozyten und Megakaryozyten synthetisiert (Sadler, 1991) und als Reaktion auf verschiedene Mediatoren der Blutgerinnung oder durch inflammatorische Zytokine aus den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen sezerniert (Denis, 2002; Wagner, 1990). Vor Stimulation mit IL-1 $\beta$  waren alle getesteten Zellkulturen positiv für vWF, nach Stimulation war vWF nur noch in geringem Umfang nachweisbar. Es wurde kein Unterschied zwischen Endothelzellen von Kindern der HIV-1- und der N-Gruppe beobachtet. Trotz der intrauterinen HIV-1-Exposition konnte die Expression der Adhäsionsmarker ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin sowie die Depletion von vWF induziert werden. Durch den Nachweis von E-Selektin und vWF konnte eine Kontamination mit Monozyten ausgeschlossen werden. Einen Überblick über die getesteten Marker gibt Tabelle 3.3.

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung wurde die Fähigkeit zur Ausbildung kapillar-ähnlicher Netzwerke in Matrigel und das Langzeitwachstumsvermögen der Zellen untersucht. Bemerkenswert war, dass sich das Langzeitwachstum von EPC nicht von dem differenzierter HUVEC und HUAEC unterschied. Die hier beobachtete Passagenzahl von 23 war vergleichbar mit den Daten von Shi und Mitarbeitern, die CD34<sup>+</sup>-Zellen aus dem Nabelschnurblut isoliert hatten und bis zu 30 mal passagieren konnten (Shi *et al.*, 1998). Die Lebensdauer von HMVEC war mit 9 Passagen deutlich geringer, was sich mit Literaturangaben deckt, die besagen, dass diese Zellen bis zu Passage 6 kultiviert werden können (Davison *et al.*, 1983).

EPC-Langzeitkulturen wiesen, unabhängig vom HIV-1-Status der Mutter, dieselbe Morphologie auf wie differenzierte, makrovaskuläre Endothelzellen. Im Gegensatz zu HUVEC, HUAEC und EPC-Langzeitkulturen waren HMVEC kleiner und runder. Obwohl bisher wenig über die Differenzierung von EPC zu reifen Endothelzellen bekannt ist, werden extrazelluläre, organspezifische Faktoren des umgebenden Gewebes, Chemokine sowie Zell-Zell-Kontakte für die charakteristische Entwicklung der EPC zu differenzierten Endothelzellen des entsprechenden Locus als notwendig erachtet (Ribatti *et al.*, 2002). Die Kultivierung frisch isolierter EPC mit



konditioniertem Medium von HMVEC und dem Zusatz von Serum sowie Stammzell-Wachstumsfaktor genügte nicht, um in den wachsenden Kulturen die Morphologie mikrovaskulärer Endothelzellen zu induzieren (Daten nicht gezeigt).

Anhand der untersuchten Endothelzellmarker konnten alle EPC-Langzeitkulturen als Endothelzellen charakterisiert werden. Marker, die zwischen mikro- und makrovaskulären Endothelzellen unterschiedlich ausgeprägt waren, wie die Morphologie und das Passagiervermögen, zeigten, dass EPC-Langzeitkulturen in die Gruppe der makrovaskulären Endothelzellen einzuordnen sind.

#### **4.3 Spezifischer Einfluss der maternalen HIV-1-Infektion auf die Expression von MMP-1**

Hinsichtlich der Wachstumseigenschaften, der Morphologie und der Expression der untersuchten Marker wurden keine Unterschiede zwischen HUVEC, HUAEC und EPC von Kindern der HIV-1-Gruppe im Vergleich zu den entsprechenden Zellen von Kindern der N-Gruppe gefunden. Allerdings wurde auf molekularer Ebene mittels cDNA-Hybridisierung (Atlas<sup>TM</sup> Human 1.2 Array) Unterschiede in der Expression von MMP-1 entdeckt.

MMP-1 gehört neben MMP-8 und MMP-13 zu den drei Kollagenasen, die interstitielle Kollagene des Typs I, II und III degradieren können (Vincenti *et al.*, 1996). Da Kollagen eine Hauptkomponente der extrazellulären Matrix ist, spielen Kollagenasen und somit auch MMP-1 eine entscheidende Rolle beim Umbau der extrazellulären Matrix (Vincenti *et al.*, 1996). Neben Endothelzellen exprimieren auch Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, Keratinozyten und zahlreiche Tumorzellen MMP-1 (Westermarck und Kahari, 1999). Für Endothelzellen ist MMP-1 während der Angiogenese von Bedeutung, um in die extrazelluläre Matrix einwandern und neue Gefäße ausbilden zu können (Seandel *et al.*, 2001).

Eine erhöhte Expression von MMP-1 korreliert mit invasiv wachsenden Kolonkarzinomen und Melanomen, rheumatischer Arthritis, mit dem Fortschreiten degenerativer Herzmuskelerkrankungen (Kardiomyopathien) und der Instabilität arteriosklerotischer Plaques mit der Gefahr der Emboliebildung (Brinckerhoff *et al.*, 2000; Ghilardi *et al.*, 2001; Keyszer *et al.*, 1998; Klimiuk *et al.*, 2002; Nikkari *et al.*, 1995; Schwartzkopff *et al.*, 2002). Krankheitsbilder, die mit einer reduzierten MMP-1-

Expression einhergehen, sind bisher nicht bekannt. Allerdings konnte kürzlich in unserem Labor nachgewiesen werden, dass die Expression von MMP-1 in Endothelzellen bei bestimmten Prozessen der Angiogenese in Entzündungen gehemmt ist (Guenzi *et al.*, 2003). Dieser Vorgang wird durch das Guanylat-Bindungsprotein-1 (GBP-1) gesteuert. GBP-1 wird in Endothelzellen durch IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  spezifisch induziert und vermittelt neben der Repression von MMP-1 den antiproliferativen Effekt der inflammatorischen Zytokine auf Endothelzellen (Guenzi *et al.*, 2001; Guenzi *et al.*, 2003; Lubeseder-Martellato *et al.*, 2002). Des weiteren belegte ein Tiermodell mit Schweinen, dass die Expression von MMP-1 nach einem Herzinfarkt sowohl im Infarktareal selbst als auch in den benachbarten Regionen unter der Nachweisgrenze liegt (Wilson *et al.*, 2003). Da in diesen Bereichen zahlreiche Entzündungszellen nachweisbar waren (Wilson *et al.*, 2003), die inflammatorische Zytokine freisetzen, unterstützt das unsere Beobachtung der gehemmten MMP-1-Expression bei entzündlichen Prozessen. Es scheint auch ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Zellen und der MMP-1-Expression zu bestehen. *In vitro* Studien belegen, dass mikrovaskuläre Endothelzellen aus höheren Passagen, weniger MMP-1 synthetisieren als solche aus niedrigeren Passagezahlen (Reed *et al.*, 2000). Da die hier verwendeten HMVEC von einer 90-jährigen Spenderin gewonnen wurden, könnte das die fehlende MMP-1-Expression in HMVEC erklären.

MMP-1 ist mit acht weiteren MMPs (MMP-3, 7, 8, 10, 12, 13, 20, 26) auf einem kurzen Abschnitt des Chromosoms 11 (11q21-11q22.3) angeordnet (Fujimoto *et al.*, 2002). Die cDNAs von sechs dieser MMPs waren auf der Atlas<sup>TM</sup> Human 1.2 *Arraymembran* ausgebracht (MMP-1, 3, 7, 8, 12, 13). Es könnte sein, dass diese MMP-Gruppe gemeinsam reguliert wird. Da aber auch in Endothelzellen der N-Gruppe kein Signal außer für MMP-1 beobachtet wurde, scheinen die MMPs in Endothelzellen, unabhängig vom HIV-Status, nicht exprimiert zu werden. Im Gegensatz dazu konnte die Expression von MMP-2, MMP-9 und MT1-MMP in Endothelzellen beider Gruppen nachgewiesen werden. Obwohl der Nachweis von MMP-2 und MT1-MMP mittels RT-PCR Unterschiede in der Expressionsstärke aufwies, so korrelierte dies nicht mit dem HIV-1-Status der Mutter. Allerdings konnte dieser Unterschied in der Gelatine-Zymografie nicht reproduziert werden. Hier war die gelatinolytische Aktivität von MMP-2 und auch von MMP-9 in Zellkulturüberständen von Endothelzellen beider Gruppen gleich stark. Diese

Befunde zeigen, dass spezifisch MMP-1 in Endothelzellen von Kindern der HIV-1-Gruppe gehemmt ist.

Die Expression von MMPs ist unter physiologischen Bedingungen streng reguliert (Westermarck *et al.*, 1997). Normalerweise ist MMP-1 auf niedrigem Level exprimiert, kann jedoch durch angiogene Wachstumsfaktoren, Phorbol ester und inflammatorische Zytokine induziert werden (Vincenti *et al.*, 1996). Die Regulation der MMP-1-Expression erfolgt vorwiegend auf der Transkriptionsebene (Westermarck *et al.*, 1997), wobei es allerdings auch Hinweise gibt, dass die Stabilität der mRNA durch Zytokine moduliert wird (Reunanen *et al.*, 2002). Eine weitere Regulierung geschieht durch die Aktivierung des Zymogens durch Serinproteasen und durch Hemmung des aktiven Enzyms durch Komplexbildung mit TIMPs (Vincenti *et al.*, 1996). Die differentielle Expression von MMP-1 in Endothelzellen von Kindern der HIV-1-Gruppe wurde auf RNA-, Protein- und auf Aktivitätsebene bestätigt. Trotz gleicher Kultivierungsbedingungen war in HUVEC, HUAEC und EPC-Langzeitkulturen der HIV-1-Gruppe im Vergleich zu Endothelzellen der N-Gruppe MMP-1 entweder unter der Nachweisgrenze oder deutlich reduziert. Eine Steigerung der MMP-1-Expression durch Behandlung mit angiogenen Wachstumsfaktoren konnte nur in Endothelzellen induziert werden, die bereits vor Induktion MMP-1 synthetisierten. Allerdings variierte die Fähigkeit zur Steigerung der MMP-1-Expression nach Behandlung mit angiogenen Wachstumsfaktoren. So konnte vor allem in EPC-Langzeitkulturen der N-Gruppe die Expression von MMP-1 wenig gesteigert werden. In sämtlichen getesteten Zellen korrelierte die RNA-Expression mit den Nachweisen auf Proteinebene, die mittels *Western Blot*-Analyse und immunzytochemischer Färbung auf Einzelzellebene durchgeführt wurden. Das weist darauf hin, dass die Unterschiede in der MMP-1-Expression in der Transkription oder der Stabilität der MMP-1-mRNA begründet sind und auf Translationsebene nicht kompensiert wird. Da die Analyse der MMP-1-Expression in differenzierten Endothelzellen und EPC-Langzeitkulturen erfolgte, die zu diesem Zeitpunkt in Passagen von 3-5 waren, muss es sich um einen Regulationsmechanismus handeln, der bei der Zellteilung stabil an die Tochterzellen weitergegeben wird. Kurzzeitige Effekte von zirkulierenden maternalen Faktoren können ausgeschlossen werden, da sie durch Mediumwechsel und Zellteilungen ausgedünnt worden wären.

#### **4.4 Ursachen und Mechanismen der reduzierten MMP-1-Expression in Endothelzellen von Kindern HIV-1-positiver Mütter**

Die Gesamtlänge des MMP-1-Promotors beträgt 4,4 kb (Rutter *et al.*, 1997). Deletionsanalysen zeigten, dass sowohl für die basale Transkription als auch für die Induktion durch Phorbol ester und bFGF ein 0,2 kb großes Fragment im 5' Bereich des Initiationsstartes essentiell sind (Newberry *et al.*, 1997; Vincenti *et al.*, 1996). Die Sequenzanalyse von zwei Kulturen der HIV-1-Gruppe mit reduzierter MMP-1-Expression zeigte keine Mutationen des MMP-1-Gens in dem Bereich. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, ob Unterschiede in der Expression von MMP-1 mit der Bindung von verschiedenen Faktoren an den Promotor korrelieren. Bei der Kultur HIV-HUVEC(1) wurden zwei SNPs nachgewiesen, dennoch können diese nicht die Ursache für die reduzierte MMP-1-Expression sein, da eine zweite Kultur der HIV-1-Gruppe [HIV-HUVEC(2)] keine SNPs aufwies.

Eine weitere Möglichkeit, die Expression eines Gens zu regulieren ist die Methylierung der DNA in der Promotorregion. Da während der Embryogenese in Säugern mehrere Phasen der Demethylierung und der Remethylierung stattfinden (Ohgane *et al.*, 2002), war ein Effekt der maternalen HIV-1-Infektion auf die Methylierung denkbar. Insbesondere da kürzlich gezeigt wurde, dass die Expression des MMP-9-Gens über den Methylierungsstatus reguliert wird (Chicoine *et al.*, 2002). Hierbei geht eine verstärkte Methylierung von CpG-Inseln mit einer verminderten Genexpression, eine verringerte Methylierung mit einer verstärkten Genexpression einher (Chicoine *et al.*, 2002). Dies konnte für die differentielle Expression von MMP-1 zwischen der HIV-1- und der N-Gruppe nicht bestätigt werden. Die Befunde unterschiedlicher Endothelzellen der HIV-1- und der N-Gruppe zeigten, dass die fünf Cytosine der CpG-Nukleotide in der Promotorregion des MMP-1-Gens einheitlich methyliert waren.

Die Expression von MMP-1 könnte auch durch ein zytoplasmatisches Protein wie GBP-1 beeinflusst sein. GBP-1 wird in Endothelzellen spezifisch durch inflammatorische Zytokine induziert und ist ein Aktivierungsmarker für Entzündungsprozesse (Guenzi *et al.*, 2001; Guenzi *et al.*, 2003; Lubeseder-Martellato *et al.*, 2002). Von besonderem Interesse ist die Tatsache, dass GBP-1 die durch inflammatorische Zytokine induzierte Hemmung der MMP-1-Expression

vermittelt (Guenzi *et al.*, 2003). Da bei HIV-1-infizierten Patienten eine deregulierte inflammatorische Zytokin- und Chemokin-Expression sowohl im Serum (Breen, 2002; Poli, 1999; Sinicco *et al.*, 1993) als auch in Trophoblastenzellen der Plazenta von Schwangeren (Moussa *et al.*, 2001) nachgewiesen sind, wäre eine verstärkte GBP-1-Expression als Ursache für die reprimierte MMP-1-Expression möglich gewesen. Allerdings konnte die inhibierte Expression von MMP-1 in Endothelzellen von Kindern HIV-1-positiver Mütter nicht auf eine erhöhte GBP-1-Expression zurückgeführt werden. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Proliferation der Endothelzellen von Kindern der HIV-1-Gruppe nicht verringert war, wie es bei einer erhöhten GBP-1-Expression erwartet worden wäre.

Es wird versucht die vertikale Transmission von HIV-1 durch Behandlung der Mutter mit AZT, einem Nukleosidanalogen, und durch Kaiserschnittentbindung zu verringern (Kind *et al.*, 1998). Dabei liegt nahe, dass die medikamentöse Behandlung mit AZT während der Schwangerschaft ein möglicher Auslöser für die reprimierte MMP-1-Expression sein könnte. Alle Frauen erhielten AZT als Monotherapie oder in Kombination mit anderen antiretroviralen Medikamenten. Die *Western Blot*-Analyse zeigte jedoch keinen Effekt des Medikamentes auf die MMP-1-Expression in HUVEC der N-Gruppe. Allerdings muss eingeschränkt werden, dass die Stimulation der Endothelzellen mit AZT *in vitro* im Vergleich zur *in vivo* Situation nur kurzzeitig war. Mitunter wurden die Frauen während der kompletten Schwangerschaft, zumindest jedoch über einige Wochen hinweg mit AZT behandelt (persönliche Mitteilung des behandelnden Arztes). Es konnte keine Korrelation der reduzierten MMP-1-Expression in Endothelzellen von Kindern HIV-1-infizierter Mütter und der verabreichten Medikamente während der Schwangerschaft beobachtet werden.

Die Tatsache, dass die maternale HIV-1-Infektion Auswirkungen auf das nicht-infizierte Kind hat, wird durch neuere Untersuchungen bestätigt. Verschiedene Publikationen weisen darauf hin, dass die Entwicklung des Fötus stark von der intrauterinen Situation beeinflusst wird (Barker *et al.*, 1989; Howard *et al.*, 1987). So wurden bei mehr als einem Drittel nicht-infizierter Kinder von HIV-1-positiven Müttern nachgewiesen, dass isolierte Leukozyten aus dem Nabelschnurblut nach Stimulierung mit einem synthetischen Peptid für das *envelope*-Protein verstärkt IL-2 synthetisierten (Clerici *et al.*, 1993; Kuhn *et al.*, 2001). In Leukozyten der Vergleichsgruppe von Kindern nicht-infizierter Mütter konnte die Produktion von IL-2

als Antwort auf die Stimulierung mit dem HIV-1-Peptid nicht beobachtet werden (Kuhn *et al.*, 2001). Darüber hinaus zeigten Clerici und Mitarbeiter, dass die Zellzahlen der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen von den Normalwerten abweichen und dass außerdem die Reifung der T-Lymphozyten in nicht-infizierten Kindern HIV-1-positiver Mütter gestört ist (Clerici *et al.*, 2000). Sie vermuten, dass zirkulierende HIV-1-Proteine die Plazenta passieren können und diesen Effekt auslösen. Im Kontext mit MMP-1 könnten jedoch auch die beschriebenen deregulierten Zytokinspiegel der T-Lymphozyten (Clerici *et al.*, 2000) zur Repression von MMP-1 beitragen, insbesondere da nachgewiesen ist, dass IFN $\gamma$  die Induktion von MMP-1 in Chondrozyten hemmt (Vincenti *et al.*, 1996).

Interessanterweise wurde im Zusammenhang mit dem Auftreten von Präeklampsie eine verminderte MMP-1-Expression in den mikrovaskulären Endothelzellen der Plazenta beschrieben (Gallery *et al.*, 1999). Das Krankheitsbild der Präeklampsie bezeichnet eine schwangerschaftsspezifische Stoffwechselstörung, deren Ursache bisher ungeklärt ist. Charakteristischerweise treten eine verminderte Durchblutung der Plazenta, beeinträchtigtes Wachstum des Fötus und bei der Mutter Bluthochdruck, verengte Gefäße und Störungen mehrerer Organe auf, die mit einer generalisierten Dysfunktion der Endothelzellen einhergehen (Gallery *et al.*, 1999). Die in dieser Arbeit beobachtete Repression der MMP-1-Expression in Endothelzellen von Kindern HIV-1-infizierter Mütter kann jedoch nicht auf das Auftreten einer Präeklampsie zurückgeführt werden, da keine der Mütter die beschriebenen Symptome zeigte (persönliche Mitteilung des behandelnden Arztes).

#### **4.5 Klinische Relevanz der MMP-1-Repression in Endothelzellen von Kindern der HIV-1-Gruppe**

Die Daten der vorliegenden Arbeit sind ein weiterer Hinweis darauf, dass die intrauterine HIV-1-Exposition auf das nicht-infizierte Neugeborene einen Einfluss hat. Trotz der kleinen Population getesteter Zellen ist die Aussagekraft der vorliegenden Daten als relevant zu erachten, da der Effekt der reduzierten MMP-1-Expression in den Endothelzellen aller Donoren von HIV-1-infizierten Müttern nachgewiesen wurde. Allerdings ist nicht bekannt, ob ein genereller Defekt vorliegt oder ob die reduzierte MMP-1-Expression nur in Endothelzellen auftritt.

Außerdem kann keine Aussage über den zeitlichen Verlauf der MMP-1-Repression gemacht werden. Es könnte sein, dass die Hemmung von MMP-1 *in vivo* nur während eines begrenzten Zeitraums auftritt, wobei dies jedoch nicht bedeutet, dass es ohne Konsequenzen für die Kinder ist. Möglicherweise sind ein oder mehrere Entwicklungsprozesse während der Schwangerschaft beeinflusst, deren Auswirkungen derzeit nicht eingeschätzt werden können. Andererseits könnte die reprimierte MMP-1-Expression auch länger nachweisbar sein, entsprechend der Beobachtung von Clerici und Mitarbeitern, die die beschriebenen Auffälligkeiten der T-Lymphozyten bei nicht-infizierten Neugeborenen und darüber hinaus auch bei älteren Kindern (5 bis 7 Jahre) von HIV-1-infizierten Müttern belegen konnten (Clerici *et al.*, 2000). In diesem Zusammenhang wäre es ebenfalls interessant zu ermitteln, ob die bei den Kindern HIV-1-infizierter Mütter beobachteten kardialen Funktionsstörungen (Lipshultz *et al.*, 2002) mit einer reprimierten MMP-1-Expression einhergehen.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Acrylamid / N,N – Methylenbisacrylamid (29:1)	BioRad
Agarose	Peqlab
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin	Sigma
Antibiotika/Antimykotika	Life Technologies
bFGF	Roche Diagnostics
Blocklösung für <i>Western-Blot</i>	Roche Diagnostics
Complete Mini (Protease-Inhibitorcocktail)	Roche Diagnostics
Coomassie <i>Brilliant Blue</i> G 250	BioRad
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP)	Roche Diagnostics
Dextransulfat	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth
Dil-Ac-LDL	Harbor Bio-Products
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
D,L-Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DMEM-Medium	Life Technologies
DNA-Isolierungs-Kit (Qiaprep)	Qiagen
DNA-Längenstandard (1 kb Leiter)	MBI-Fermentas
Endothelzellbasalmedium-2 MV (EBM)	Cambrex (Vervier, B)
ECL-Nachweissystem (Filme, Reagenzien)	Amersham Pharmacia
Ethidiumbromid	Roth
Fibronektin	Becton Dickinson
Ficoll	Amersham Pharmacia
Fötales Kälberserum (FKS)	Life Technologies/Invitrogen
Gelatine	Sigma
Gel-Blotting-Papier	Schleicher und Schuell
Glutamin	Life Technologies/Invitrogen
Hybond P-Membran (PVDF)	Amersham Pharmacia
IFN $\gamma$	Roche Diagnostics



IL-1 $\beta$	Roche Diagnostics
Kollagen I, Ratte	Becton Dickinson
Kollagenase	Sigma
Matrigel (growth factor reduced matrigel)	Becton Dickinson
Natrium-Laurylsarcosylsulfat	Serva
Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Merck (Darmstadt)
<i>PAP Pen</i>	Zymed Laboratories
<i>PCR-Mastermix</i>	Promega
<i>PCR-Purification Kit</i>	Qiagen
Penicillin/ Streptomycin	Seromed (Berlin)
Rainbow-Protein-Größenstandard	Amersham-Pharmacia
Pferdeserum	Life Technologies/Invitrogen
Rainbow Protein-Molekulargewichtsmarker	Amersham Pharmacia
<i>RNeasy-Kit</i>	Qiagen
RPMI 1640-Medium	Life Technologies
SDS	Roth
sonifizierte Heringsspermien-DNA	Roche Diagnostics
<i>Stem Cell Growth Factor</i>	PeproTech
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	BioRad
10 x Tris/Glycerin/SDS-Puffer	BioRad
TEMED	BioRad
TNF $\alpha$	Roche Diagnostics
Tween 20	Sigma
VEGF	R&D Systems
Ziegenserum	Jackson ImmunoResearch

Alle sonstigen Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen und waren von analytischem Reinheitsgrad.

### 5.1.2 Antikörper

*Magnetic Cell Sorting and Separation CD34*

Miltenyi Biotec

### 5.1.2.1 Primäre monoklonale Antikörper

Tabelle 5.1: Verwendete primäre monoklonale Antikörper.

Primärer Antikörper	Spezies	Verwendung	Herkunft
Anti-CD31	Maus	Immunzytochemie 1:300	Dako Klon JC/70A
Anti-CD105	Maus	Immunzytochemie 1:300	Dako
Anti-E-Selektin	Maus	Immunzytochemie 1:300	Santa Cruz CTB202
Anti-GAPDH	Maus	Western Blot: 1:30000 bis 1:50000	Chemicon
Anti-human GBP-1; 1B1	Ratte	Western Blot: 1:500;	C.Lubeseder-Martellato
Anti-ICAM-1	Maus	Immunzytochemie 1:300	Zymed
Anti-MMP-1	Maus	Immunzytochemie 1:100 Western Blot: 1:500	Oncogene R&D Systems
Anti-VCAM-1	Maus	Immunzytochemie 1:300	Dako
Anti-vWF	Maus	Immunzytochemie 1:200	Dako

### 5.1.2.2 Sekundärantikörper

Tabelle 5.2: Verwendete Sekundärantikörper.

Sekundär-antikörper	Spezies	Verwendung	Herkunft
Anti-Maus IgG–HRP	Schaf	WB: 1:5000	Amersham Pharmacia
Anti-Ratte IgG–HRP	Ziege	WB: 1:5000	Dako
Anti-Maus-AlexaFluor 488	Ziege	Immunzytochemie: 1:500	Molecular Probes

### 5.1.3 Radiochemikalien

$\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dATP (3000 Ci/mM)

Hartmann Analytics

### 5.1.4 Enzyme

DNAse I

BD Clontech

DyNAzyme I

Finnzymes (Espoo, FI)

SuperScript™ II Reverse Transcriptase

Invitrogen

Trypsin/EDTA

LifeTechnologies/Invitrogen

### 5.1.5 Biologisches Material

#### Primäre Zellen:

HMVEC - humane mikrovaskuläre Endothelzellen

HUVEC - humane Nabelschnurendothelzellen der Vene

HUAEC - humane Nabelschnurendothelzellen der Arterie

EPC - zirkulierende endotheliale *Precursor*-Zellen

HUVEC von Kindern HIV-1-negativer Mütter (Angabe des Herstellers) und HMVEC wurden von Cambrex Bio Science bezogen. HUVEC stammten von zwei Einzeldonoren, die HMVEC aus der Haut einer 90-jährigen weiblichen Person.

Die Isolierung von EPC wurde wie unter Kapitel 5.2.2.3., die Isolierung von HUVEC und HUAEC von Kindern HIV-1-infizierter Mütter wurde wie unter Kapitel 5.2.2.4. beschrieben durchgeführt.

#### Zelllinien

pG13/J7 Verpackungszelllinie zur Produktion von Viruspartikeln (Miller *et al.*, 1991) wurde aus dem Labor von B. Ensoli (Rom) bezogen

### Retroviraler Vektor

pBabePuro das retrovirale Vektorsystem zur Transduktion von humanen Endothelzellen (Morgenstern und Land, 1990) wurde aus dem Labor von B. Ensoli (Rom) bezogen

#### **5.1.6 Geräte**

LSM 410	Zeiss
Digitalkamera Coolpix 995	Nikon
Tischzentrifuge	Sigma
Kühlzentrifuge 1K15	Sigma

#### **5.2 Methoden**

##### **5.2.1 Allgemein benötigte Puffer, Lösungen und Medien**

(Spezielle Lösungen sind bei den einzelnen Methoden angegeben)

Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Behandlung wässriger Lösungen zur Hemmung von RNasen.

Zu 1 l wässriger Lösung wurde 1 ml DEPC gegeben und die Lösung über Nacht bei RT langsam gerührt. Anschließend wurde DEPC durch zweimaliges Autoklavieren deaktiviert.

##### 10 x PBS:

NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g
ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	

Nach dem Autoklavieren wurde mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

20 x SSC:

NaCl	175,3 g
Na-Citrat x 2 H <sub>2</sub> O	88,2 g
ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	

Nach dem Autoklavieren wurde mit wenigen Tropfen 2 N NaOH der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

TE-Puffer:

1 M Tris/HCl (pH 8,0)	10 ml
0,5 M EDTA	2 ml
ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	

## **5.2.2 Zellbiologische Methoden**

### **5.2.2.1 Allgemeine Zellkultur**

#### **Primäre Zellen**

Die Kultivierung der primären HUVEC, HUAEC und HMVEC erfolgte in Endothelzellmedium (Cambrex) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in gelatinisierten Zellkulturflaschen.

Zum Gelatinisieren wurde die Gelatine auf 37°C erwärmt in ausreichender Menge in die Zellkulturflasche gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Überschüssige Gelatine wurde am nächsten Tag wieder abgenommen und die gelatinisierte Zellkulturflasche mit Medium gewaschen.

Gelatine 1,5%:

Gelatine	7,5 g
1 x PBS	500 ml

Die Gelatine wurde bei 65°C für 1 Stunde unter ständigem Rühren gelöst, anschließend autoklaviert, sterilfiltriert, aliquotiert und bei 4°C aufbewahrt.

Vollmedium (EBM-5%FKS):

Endothelbasalmedium (EBM)-2 MV	500 ml
EGM-2 BulletKit:	
Hydrocortison	0,2 ml
hEGF	2 ml
Gentamicin / Amphotericin-B	0,5 ml
hVEGF	0,5 ml
Ascorbinsäure	0,5 ml
hR <sup>3</sup> -IGF-1 ( <i>human recombinant insulin-like growth factor</i> )	0,5 ml
hFGF-2 ( <i>human fibroblast growth factor-2</i> )	0,5 ml
FKS	25 ml
Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 µg/ml)	5 ml
Amphotericin-B (25 µg/ml)	5 ml

Low Medium:

0, 5% FKS	2,5 ml
Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 µg/ml)	5 ml

Zur Passagierung wurden die Zellen 2 mal mit 1 x PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst und mit frischem Vollmedium max. 1:6 verdünnt wieder ausgesät. Eine Passage entspricht einer Verdünnung der Zellen von 1:4.

**Zelllinien**

Die Kultivierung der Zelllinien PG13/J7 erfolgte in DMEM-Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

DMEM -Wachstumsmedium:

Grundmedium: DMEM

Zusätze:

10% FKS

2 mM L-Glutamin

Penicillin/Streptomycin (final: 100 U Penicillin, 100 µg Streptomycin)

1 x *non essential amino acids*\*

(\* enthält L-Alanin, L-Asparagin, L-Asparaginsäure, L-Glutaminsäure, Glycin, L-Prolin, L-Serin)

Konzentration an Selektionsmittel:

Die zur Transfektion und anschließender Transduktion eingesetzten Vektoren stammen alle von dem Ausgangsvektor pBabePuro ab, der als Resistenzgen Puromycin kodiert (Morgenstern und Land, 1990). Für die Bildung stabiler Transfektanten beziehungsweise Transduktanten wurden folgende Konzentrationen an Puromycin verwendet:

Transfektion:	PG13/J7	3,0 µg/ml
Transduktion:	HUVEC	0,3 µg/ml.

Stammhaltung:

Zur Lagerung der Zellen wurden diese sedimentiert und in 1 ml Medium mit 20% FBS und 10% DMSO aufgenommen und nach dem Einfrieren bei –80°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

**5.2.2.2 Isolierung von PBMZ aus dem Blut**

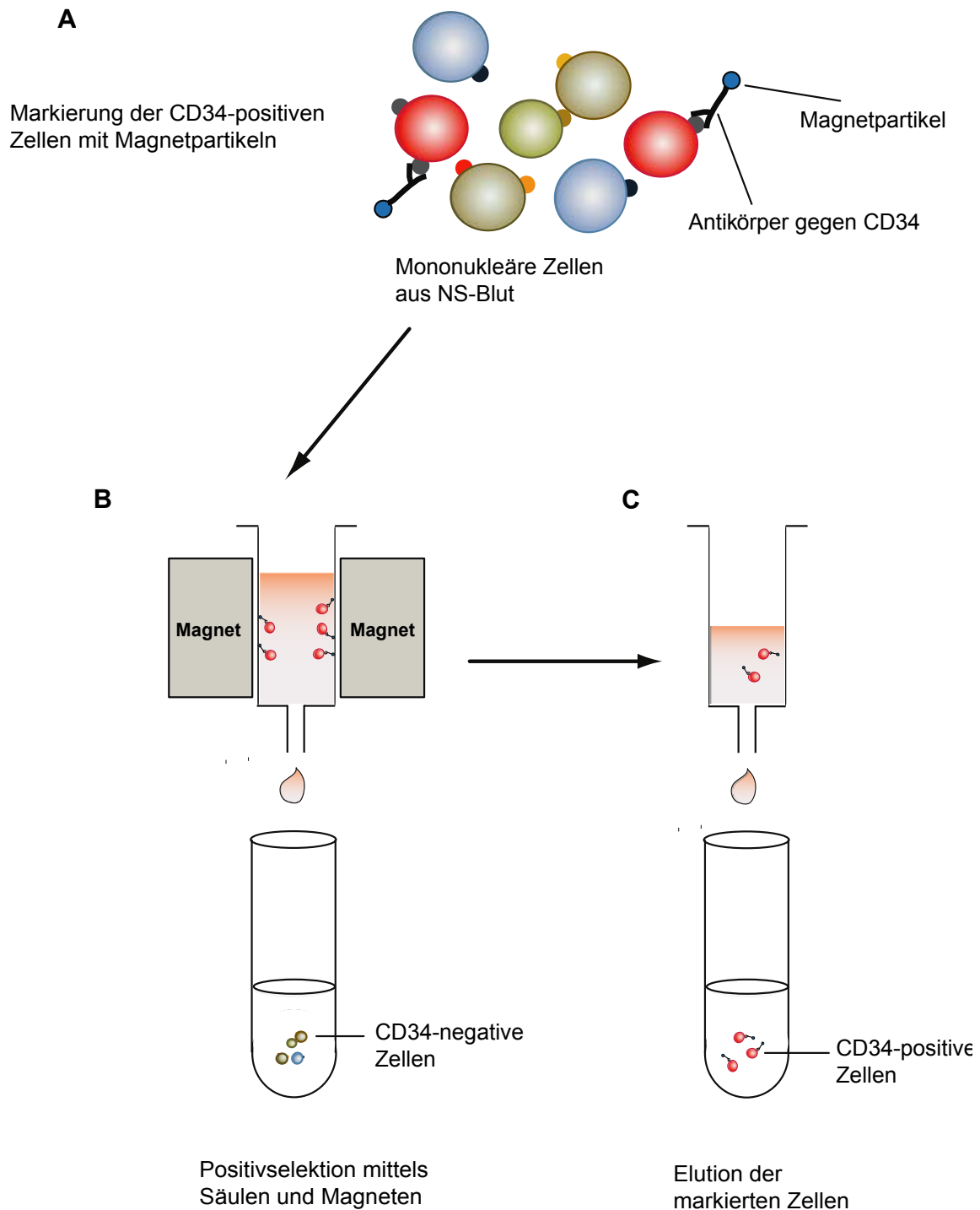
Es wurde ausschließlich antikoaguliertes Blut verwendet, das nicht älter als 4 Std. war. PBMZ wurden aus frischem mit Citratlösung oder Heparin behandelten Blut von gesunden Personen oder von Nabelschnurblut von Kindern HIV-1-infizierter oder nicht-infizierter Mütter durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS

(Amersham Pharmacia) isoliert. Dazu wurde das Blut mit einem Volumen PBS mit 2 mM EDTA und 0,5% BSA gemischt, davon jeweils 15 ml vorsichtig auf 15 ml Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS gegeben und zentrifugiert (400 x g, 20 Minuten [Min] bei RT). Anschließend wurden die PBMZ aus der Interphase isoliert, zwei mal mit PBS mit 2 mM EDTA und 0,5% BSA gewaschen und zentrifugiert (300 x g, 10 Min bei RT). Nach dem zweiten Waschschrift wurde das Zellpellet in 300 µl Puffer aufgenommen.

#### **5.2.2.3 Isolierung und Kultivierung von EPC aus der PBM-Zellfraktion**

Das Prinzip der Isolierung der EPC erfolgt mittels Positiv-Selektion der CD34 exprimierenden Zellen mit Magnetpartikeln (Miltenyi Biotec). Dazu wurden die isolierten PBMZ mit 100 µl Blocking Reagenz und 100 µl anti-CD34-gekoppelten Magnetpartikeln für 30 Min bei 4°C inkubiert (Abb. 20A), anschließend mit PBS gewaschen und zentrifugiert (300 x g, 10 Min bei RT). Das Zellpellet wurde in 500 µl PBS mit 2 mM EDTA und 0,5% BSA aufgenommen und in einer vorgewaschenen (500 µl PBS mit 2 mM EDTA und 0,5% BSA) MS<sup>+</sup>/VS<sup>+</sup> Säule in einem magnetischen Feld (VarioMACS, Miltenyi Biotec) ausgebracht (Abb. 20B). Nachdem die CD34-positiven Zellen von den CD34-negativen Zellen abgetrennt waren, wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt, die isolierten Zellen eluiert (Abb. 20C) und nochmals auf einer zweiten Säule im Magnetfeld abgetrennt. Danach wurden die CD34-positiven Zellen zentrifugiert (300 x g, 10 Min bei RT), in Vollmedium (EBM) mit 10% FKS, 10% PKS und 20 ng/ml Stammzell-Wachstumsfaktor aufgenommen und mit einer Zellzahl von maximal  $5 \times 10^4$ /ml in einem 24-Kammer-Kulturgefäß auf Fibronectin (5 µg/cm<sup>2</sup>) ausgebracht. Bis zur ersten Passagierung wurde die Hälfte des Mediums alle vier bis fünf Tage erneuert, die Zugabe von Stammzell-Wachstumsfaktor erfolgte nur während der ersten zwei Wochen. Sobald die EPC einen konfluenten Zellrasen ausbildeten, wurden sie in ein größeres, gelatinisiertes Kulturgefäß umgesetzt. Ein konfluentes Zellkulturgefäß mit der Fläche von 25 cm<sup>2</sup> (T25, Costar) wurde als Passage 1 definiert.





**Abb. 20: Schematische Darstellung der Isolierung CD34-positiver endothelialer *Precursor*-Zellen (EPC) aus Nabelschnurblut mit Magnetpartikeln.**

Mononukleäre Zellen aus dem Blut der Nabelschnur wurden mit anti-CD34-gekoppelten Magnetpartikeln inkubiert (A) und anschließend die CD34-positiven Zellen mit Hilfe einer Säule in einem magnetischen Feld von den CD34-negativen Zellen abgetrennt (B). Nach Entfernen des Magneten wurden die markierten Zellen eluiert (C).

#### **5.2.2.4 Isolierung von Endothelzellen aus der Nabelschnur**

Die Isolierung von HUVEC und HUAEC erfolgte nach der Methode von Jaffe und Mitarbeiter (Jaffe *et al.*, 1973). Die Nabelschnur wurde kurz nach der Entbindung von der Plazenta abgetrennt und in steriler physiologischer Kochsalzlösung bis zur Isolierung aufbewahrt. Diese erfolgte innerhalb der nächsten Std.

Nach der äußeren Desinfektion der Nabelschnur mit 70%igem Ethanol wurde an beiden Seiten ungefähr 1 cm abgetrennt, die jeweilige Vene oder Arterie mit Hilfe einer stumpfen Kanüle (Knopfkanüle) punktiert und mit PBS gespült, um verbliebene Blutreste und Thromben zu entfernen. Anschließend wurde die Nabelschnur mit 0,1%iger Kollagenaselösung gespült, eine Seite der Nabelschnur mit einer Klemme verschlossen, das Blutgefäß mit 0,1%iger Kollagenaselösung gefüllt und 30 Min bei 37°C inkubiert. Vor dem Öffnen der Vene oder Arterie wurde die Nabelschnur leicht massiert, um die Ablösung der Endothelzellen zu forcieren. Danach wurde sie mit Medium gespült und die isolierten Zellen zentrifugiert (1200 x upm, 10 Min, RT). Das Zellpellet wurde in frischem Vollmedium (EBM) mit 20% FKS aufgenommen und in ein gelatinisiertes 6-Kammer-Kulturgefäß überführt. Nach 2 Std. wurde das Medium gewechselt und nicht-adhätierende HUVEC in ein neues Kulturgefäß überführt. Nach vier bis fünf Tagen waren HUVEC/HUAEC konfluent und konnten erstmals passagiert werden.

#### **5.2.2.5 Untersuchungen der Morphologie von EPC und HUVEC**

EPC und HUVEC der HIV-1- und der N-Gruppe ( $2 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>) ähnlicher Passagenzahl wurden in gelatinisierten 30 mm-Kulturschalen ausgebracht und einen Tag in Vollmedium kultiviert. Mit einer Digitalkamera (Nikon, Coolpix 995) wurden die Phasenkontrastbilder der Zellen dokumentiert.

#### **5.2.2.6 Langzeitkultivierung von HUVEC, HUAEC, EPC und HMVEC**

Die Lebensdauer der primären HMVEC, HUVEC, HUAEC und EPC der HIV-1- und der N-Gruppe wurde anhand der Passagenzahl bestimmt. Dazu wurden die Zellen in gelatinisierten Kulturgefäßen definierter Größe (75 cm<sup>2</sup>) ausgebracht und bis zu einer Konfluenz von 90% in Vollmedium kultiviert. Zur Passagierung wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst und mit frischem

Vollmedium 1:6 verdünnt wieder ausgesät, was einer Passagezahl von 1,5 entspricht. Eine einzelne Passage entspricht einer Verdünnung der Zellen von 1:4. Der durchschnittliche Zeitabstand zwischen den Zellteilungen war 5 Tage.

#### **5.2.2.7 Morphologische Untersuchungen von HUVEC und EPC auf Matrigel**

Endothelzellen besitzen die Fähigkeit auf Matrigel kapillarähnliche Strukturen auszubilden. Matrigel, ein Modellsystem der extrazellulären Matrix, enthält als Hauptmatrixkomponenten Laminin, Kollagen Typ IV, Entactin und Heparansulfat-Proteoglykan (Grant *et al.*, 1985; Kleinman *et al.*, 1986).

Über Nacht auf Eis aufgetautes flüssiges *growth factor-reduced* GFR-Matrigel (Becton Dickinson) wurde bei 4°C in 30 mm-Kulturschalen ausgebracht (300 µl/Schale) und zum Festwerden für 2 Std. bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach vorsichtigem Waschen der Schalen mit Vollmedium wurden HUVEC und EPC der HIV-1- beziehungsweise der N-Gruppe in Vollmedium auf dem Matrigel mit einer Zelldichte von  $1,5 \times 10^5$  Zellen/Schale ausgebracht. Die Kontrollzellen wurden in gelatinisierten 30 mm-Kulturschalen mit gleicher Zellzahl ausgebracht. Nach dem Anwachsen der Zellen nach 2 Std. wurde das Medium auf Low Medium mit angiogenen Wachstumsfaktoren (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) gewechselt und die Zellen für weitere 24 Std. kultiviert. Mit einer Digitalkamera (Coolpix 995) wurden die Phasenkontrastbilder der Zellen dokumentiert.

#### **5.2.2.8 Immunzytochemische Färbungen zum Nachweis von MMP-1, CD31, CD105, ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin und vWF**

Die Antigene wurden durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen. Hierfür wurden die zu untersuchenden Zellen auf gelatinisierten [für den Nachweis von MMP-1 auf Kollagen I (5 µg/ml)] 8-Kammer-Objektträgern (Becton Dickinson Labware) mit einer Zelldichte von  $4 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und für 12 Std. in Vollmedium kultiviert. Stimulierte Zellen wurden mit dem entsprechenden inflammatorischen Zytokin in Low Medium (IL-1β, 100 U/ml für 14 Std.; TNFα 300 U/ml für 8 Std.) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2% Paraformaldehyd (PFA; RT, 20 Min) fixiert. Danach wurden die Zellen mit PBS für 5 Min gewaschen, für 5 Min mit 0,1% Triton-X100 permeabilisiert und erneut zweimal mit PBS gewaschen. Zum Blockieren unspezifischer

Antikörperbindungsstellen wurden die Zellen für 20 Min in einer feuchten Kammer mit 10% Ziegenserum in PBS benetzt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper ( $\alpha$ -MMP-1, 1:100;  $\alpha$ -CD31, 1:300;  $\alpha$ -CD105, 1:300,  $\alpha$ -ICAM-1, 1:300;  $\alpha$ -VCAM-1, 1:300;  $\alpha$ -E-Selektin, 1:300;  $\alpha$ -vWF-1, 1:200), verdünnt in 5% Ziegenserum, über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Nicht gebundene Antikörper wurden mit PBS abgewaschen (5 Min, RT) und die Zellen mit dem Sekundärantikörper ( $\alpha$ -Maus-AlexaFluor 488, 1:500), verdünnt in 5% Ziegenserum, inkubiert (1 Std., RT, feuchte Kammer). Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellkerne durch Inkubation für 4 Min mit 1  $\mu$ g/ml 4',6'-diamino-2-phenylindol (DAPI, Molecular Probes) sichtbar gemacht und zweimal in PBS gewaschen. Die Objektträger wurden mit 50% Glycerol/PBS beschichtet und mit einem Deckglas versehen. Die Auswertung erfolgte am LSM 410 (Zeiss).

#### 4% Paraformaldehyd:

Paraformaldehyd	20 g
10N NaOH	3 $\mu$ l
10 x PBS	50 ml
ad 500 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	

Paraformaldehyd wurde in 400 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 60-65°C erwärmt, dann erfolgte die Zugabe von NaOH unter rühren bis die Lösung klar war. PBS wurde zugegeben, filtriert und mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 500 ml aufgefüllt.

#### **5.2.2.9 Nachweis der Aufnahme von Dil-Ac-LDL**

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf gelatinisierten 8-Kammer-Objektträgern (Becton Dickinson Labware) mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgebracht und über Nacht in Vollmedium kultiviert. Nach Inkubation mit Vollmedium und 4  $\mu$ g/ml Dil-Ac-LDL (mit rotem Fluoreszenzfarbstoff markiertes Ac-LDL) für 1 Stunde bei 37°C und Lichtschutz, wurden die Zellen 5 mal mit PBS gewaschen und mit 2% PFA (RT, 20 Min) fixiert. Die Objektträger wurden mit 50% Glycerol/PBS beschichtet und mit einem Deckglas versehen. Die Auswertung erfolgte am LSM (Zeiss).

#### 5.2.2.10 Produktion infektiöser retroviraler Partikel

Zur Produktion infektiöser Viruspartikel wurden zunächst Zellen der Verpackungszelllinie PG13/J7 (Miller *et al.*, 1991) transfiziert und zur Erzeugung stabiler Zellklone mit Puromycin selektioniert. Dazu wurde in den retroviralen Vektor pBabePuro (Morgenstern und Land, 1990) die gesamte cDNA von GBP-1 in *antisense*-Orientierung kloniert (Cornali *et al.*, 1996). Die Transfektion der Verpackungszellen mit den retroviralen Vektoren erfolgte durch Lipofektion mit SuperFect (Qiagen) nach Angaben des Herstellerprotokolls zur stabilen Transfektion adhärenter Zellen. Die Verpackungszellen wurden dazu in 60-mm-Kulturschalen ausgebracht und bei einer Zelldichte von 70-80% mit 5 und 10 µg Plasmid-DNA transfiziert. 48 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen 1:12 in DMEM-Wachstumsmedium und 3 µg/ml Puromycin als Selektionsmittel passagiert. Nach einer Selektionsdauer von 10 Tagen wurden die Viruspartikel aus den Kulturüberständen isoliert und die Virustiter semiquantitativ mittels RT-PCR bestimmt. Dazu wurden die Zellen bei einer Dichte von ca. 80% mit frischem Wachstumsmedium versehen, nach 12 Std. die Virus-enthaltenden Zellkulturüberstände abgenommen und zum Entfernen von Zellbestandteilen filtriert (0,45 µm). Mit Hilfe des *High Pure viral RNA Kit* (Roche) wurde die virale RNA aus den Überständen isoliert und in einer RT-PCR mit sequenzspezifischen Primern in cDNA umgeschrieben. Bei beiden Ansätzen hybridisierten der verwendete 5' Primer in der GAG-Sequenz des Vektors, der 3' Primer für *Antisense*-GBP-1 hybridisierte an die Nukleotide +1141 bis +1162 (Fragmentlänge des PCR-Produktes 527 bp) und der 3' Primer für den Leervektor hybridisierte in der GAG-Sequenz an die Nukleotide 1526 bis 1547 (Fragmentlänge des PCR Produktes 375 bp). Hierbei wurde der *Titan one step reaction procedure Kit* (Roche) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Durch Variation der Zyklenanzahl und Verdünnung der viralen RNA wurden die retroviralen Partikel überprüft sowie die Titer semiquantitativ bestimmt. Die Reaktionsbedingungen der RT-PCR wurden wie folgt eingestellt: 50°C, 30 Min; 96°C für 2 Min, anschließend 10 Zyklen mit je 94°C für 30 Sek (Denaturierung), 52°C für 30 Sek (Hybridisierung) und 68°C für 1 Min (Synthese); gefolgt von 25 Zyklen mit einer Synthesedauer von 1 Min 30 Sek. Die Menge des Virus wurde anhand der Intensität der PCR-Banden abgeschätzt und äquivalente Mengen zur Transduktion der Endothelzellen eingesetzt.

#### **5.2.2.11 Transduktion von HUVEC**

Für die Transduktion der Endothelzellen wurden die viralen Überstände der transfizierten Verpackungszellen verwendet. Dazu wurden die Zellen bei einer Dichte von 80% mit frischem DMEM-Wachstumsmedium versehen und ohne Zusatz von Puromycin kultiviert. Nach 12 – 15 Std. wurden die Überstände filtriert (0,45 µm) und mit 8 µg/ml Polybren (Sigma) versetzt, womit eine Verbesserung der Infektion erreicht wird. Zur Transduktion wurden die HUVEC für jeweils 2 x 4 Std. mit den virushaltigen Medien inkubiert, unterbrochen durch eine Inkubation mit frischem Endothelzellmedium für 4 Std. Um die Transduktionseffizienz zu steigern, wurde die Infektion am darauffolgenden Tag wiederholt. Nach 48 Std. wurden die Zellen 1:2 passagiert und zur Selektion stabiler Transduktanten mit 0,3 µg/ml Puromycin versetzt. Bevor die Zellen für weitere Versuche verwendet werden konnten, erfolgte eine Selektion mit einer Dauer von mindestens 10 Tagen, wobei aller 2-3 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt wurde.

### **5.2.3 Proteinchemische Methoden**

#### **5.2.3.1 Quantitative Proteinbestimmung der RIPA-Extrakte nach Bradford**

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurden die Lösungen des *BIORAD DC Protein Assay* nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Das Prinzip dieser kolorimetrischen Messung basiert auf der Methode nach Lowry, bei der die Proteine zunächst mit einem alkalischen  $\text{Cu}^{2+}$ -Reagenz eine Verbindung eingehen. Anschließend wird Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenzes (Folin-Reagenz) zugegeben, das durch die  $\text{Cu}^{2+}$ -komplexierten Proteine reduziert wird. Bei der Reduktion erfolgt der Farbumschlag des Folin-Reagenz von gelb nach blau, dessen Absorption bei 750 nm mit einem Spektralphotometer gemessen wird. Anhand einer Standardkurve mit verschiedenen BSA-Konzentrationen wurden die erhaltenen Absorptionsmesswerte (Duplikate) in die dazugehörenden Konzentrationen umgerechnet.

### 5.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) werden Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Durch Zusatz von Sodiumdodecylsulfat (SDS) und das Erhitzen der SDS-Proteinlösung werden nichtkovalente Wechselwirkungen in nativen Proteinen aufgehoben. Eine Reduzierung der Disulfidbrücken des Proteins kann durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT) oder  $\beta$ -Mercaptoethanol erreicht werden. Die denaturierten Polypeptide binden SDS-Anionen und erhalten dadurch eine negative Ladung. Da die Menge an gebundenem SDS proportional zum Molekulargewicht der Proteine ist, wandern die SDS-Polypeptidkomplexe entsprechend der Größe der Polypeptide durch das Polyacrylamidgel. Als Referenz zur Bestimmung der Größe dienen Markerproteine mit bekanntem Molekulargewicht.

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele, bestehend aus zwei Einheiten: einem 5%igem Sammelgel (pH 6,8) und einem Trenngel (pH 8,8) gegossen. Als Gelapparaturen wurden *mighty small* Gießstände und Laufkammern (Amersham Pharmacia) benutzt. Für die Herstellung der Trenngele wurde je nach Größe der zu analysierenden Proteine, die Konzentration an Polyacrylamid auf 10-15 % eingestellt.

#### Acrylamid-Stammlösung:

Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung 37,5% / 1%

#### Trenngelpuffer -Stammlösung:

Tris	91,0 g
SDS	2,0 g
ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> , pH mit HCl auf 8,8 einstellen	

#### Sammelgelpuffer-Stammlösung:

Tris	30,5 g
SDS	2,0 g
ad 500 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> , pH mit HCl auf 6,8 einstellen	

10 x Elektrophoresepuffer:

Tris	30,3 g
Glycin	144,1 g
SDS	10,0 g
ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	

4-fach Probenpuffer:

β-Mercaptoethanol 13,4 M	2,3 g
SDS	0,6 g
Bromphenolblau	10,0 mg
Glyzerin 87%	4,0 ml
Tris	0,1 g
ad 10 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> , pH mit HCl auf 6,7 einstellen	

Ammoniumpersulfat (APS):

10% APS in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Herstellung des Gels:

In der folgenden Tabelle ist die Zusammensetzung für je 5 ml Trenngel sowie 2 ml Sammelgel aufgeführt.

**Tab. 5.3: Reagenzien zur Herstellung von denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen.**

Komponente	Trenngel 10%	Trenngel 12%	Trenngel 15%	Sammelgel 5%
H <sub>2</sub> O	1,9 ml	1,6 ml	1,1 ml	1,4 ml
30% Acrylamid Mix (29:1)	1,7 ml	2,0 ml	2,5 ml	0,33 ml
1,5 M Tris pH 8.8	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	-
1,0 M Tris pH 6.8	-	-	-	0,25 ml
10% SDS	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,02 ml



10% Ammoniumpersulfat	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,02 ml
TEMED	0,002 ml	0,002 ml	0,002 ml	0,002 ml

Die aufzutrennenden Proteinlösungen wurden mit 2 x SDS-Probenpuffer (BioRad) versetzt und für 5 Min bei 100°C denaturiert. Um die Disulfidbrücken zu reduzieren, wurde dem Probenpuffer  $\beta$ -Mercaptoethanol nach Angaben des Herstellers zugefügt. Die Elektrophorese erfolgte bei 20 mA/Gel in 1 x SDS-Laufpuffer (10 x SDS Tris/Glycin – Laufpuffer, BioRad).

## 5.2.4 Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

### Färbelösung:

Coomassie <i>Brilliant Blue</i> G 250	1,5 g
Methanol	455 ml
Eisessig	80 ml
ad 1000 ml $H_2O_{bidest}$	

### Entfärber:

Methanol	250 ml
Eisessig	350 ml
ad 1000 ml $H_2O_{bidest}$	

Die Gele wurden nach der Elektrophorese bei RT 60 Min in der Färbelösung inkubiert und leicht geschwenkt. Anschließend wurde das Gel so lange mit Entfärber inkubiert, bis die Protein- beziehungsweise Zymografiebanden sichtbar wurden.

### 5.2.4.1 Elektrotransfer von Proteinen

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe einer Tankblot-Apparatur (Amersham Pharmacia) auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurde das Proteingel luftblasenfrei auf die Membran gelegt, zwischen mehrere Schichten

mit Transferpuffer getränktem 3-MM-Whatmanpapier gepackt und in die Apparatur eingesetzt. Der Proteintransfer vom Gel auf die Membran erfolgte elektrophoretisch in Transferpuffer bei 250 mA für 2 Std.

Transferpuffer:

Tris	5,8 g
Glycin	2,9 g
10% SDS-Lösung	3,7 ml
Methanol	200 ml
ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	

#### **5.2.4.2 Western Blot-Analyse**

Unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern wurden verschiedene Proteine immunochemisch im *Western Blot* nachgewiesen. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt und auf eine Hybond PVDF-Membran transferiert. Danach wurde die Membran wie folgt weiterbehandelt:

- blockieren der Membran, um unspezifische Proteinbindungen zu verhindern: 1 x *Blocking Solution* (Roche) in PBS-0,1%Tween20, über Nacht, 4°C
- PBS-0,1%Tween20, 15 Min, RT, unter Schwenken
- PBS-0,1%Tween20 mit 0,5% Blocking Solution (Roche), 5 Min, RT, unter Schwenken
- Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper, gelöst in PBS-0,1%Tween20 mit 0,5% Blocking Solution (Roche); 1 Stunde, RT
- Waschen der Membran mit PBS-0,1%Tween20, 3 x 10 Min, RT, unter Schwenken
- PBS-0,1%Tween20 mit 0,5% Blocking Solution (Roche), 10 Min, RT, unter Schwenken
- Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper, gelöst in PBS-0,1%Tween20 mit 0,5% Blocking Solution (Roche); 1 Stunde, RT

- Waschen der Membran mit PBS-0,1%Tween20, 4 x 10 Min, RT, unter Schwenken.

Als Sekundärantikörper wurden *horseradish peroxidase* (HRP) – gekoppelte Antikörper verwendet, sodass der Nachweis der Proteine über eine von Peroxidase katalysierte Reaktion, mittels Chemilumineszenz erfolgte. Dabei wird durch die Peroxidase die Oxidation von Luminol katalysiert, was durch die Exposition mit einem Röntgenfilm nachgewiesen werden kann. Hierzu wurde das *ECL Detection System* sowie ECL-Röntgenfilme der Firma Amersham Pharmacia verwendet und nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

#### **5.2.4.3 Herstellung von Proteinextrakten aus eukaryontischen Zellen**

Zur Isolierung von Gesamtprotein aus adhärenenten Zellen wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und durch anschließendes Behandeln mit Trypsin/EDTA abgelöst. Nach Aufnahme der Zellen in Kulturmedium wurden die Zellpellets durch Zentrifugation gesammelt, 3 x mit PBS gewaschen und in Ripa-Puffer resuspendiert. Nach der Zellyse bei 4°C für 15 Min wurde das Zelllysatz zentrifugiert (14000 upm, bei 4°C 15 Min), der Überstand abgenommen und das Pellet verworfen. Die Lagerung der Proteinextrakte erfolgte bei –20°C.

#### Ripa-Puffer:

Tris/HCl, pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
Nonidet P40	1 %
Natriumdesoxycholat	0,5 %
SDS	0,1 %
1 CompleteMini*-Tablette (Roche) auf 10 ml	

#### **5.2.4.4 Zymografie**

Die MMP-1 Aktivität im Medium von kultivierten HUVEC und EPC der HIV-1- und der N-Gruppe wurde mittels Substrat-Gelelektrophorese (Zymografie) nach dem

Protokoll von Lafleur und Mitarbeitern untersucht (Lafleur *et al.*, 2001). Dazu wurden die Zellen ( $2 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>) in einem gelatinisierten 30mm Kulturgefäß ausgebracht und bis zu 80% Konfluenz kultiviert. Dann wurden sie dreimal mit serumfreiem Medium gewaschen und für 20 Std. mit serumfreiem Medium ohne oder mit angiogenen Wachstumsfaktoren (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) inkubiert. Das konditionierte Medium wurde abgenommen, zentrifugiert (4500 x g, 10 Min bei 4°C) und mit Tris-HCL (pH 8,0) bis zu einer Endkonzentration 50mM versetzt. 25 µl des konditionierten Mediums wurden in einem 10% SDS-PAGE mit 0,1% Gelatine unter nicht-reduzierenden Bedingungen bei 20 mA aufgetrennt, bis die Bromphenolbande das Trenngel erreicht hatte. Dann wurde die Stromstärke auf 30 mA erhöht und die Proben so lange aufgetrennt, bis die Bromphenolbande komplett aus dem Gel gelaufen war. Zur Rekonstitution von MMP-1 wurde SDS ausgewaschen, indem das Gel über Nacht in 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) / 5 mM CaCl<sub>2</sub> / 2,5% (v/v) Triton X-100 und anschließend für 18 Std. in 50mM Tris/HCl (pH 7,5) 5mM CaCl<sub>2</sub> bei 37°C inkubiert wurde. Danach wurde das Gel in Coomassie *Brilliant blue* 250 gefärbt. Der Abbau des Substrates kann als helle Bande nachgewiesen werden.

## 5.2.5 DNA-Technologie

### 5.2.5.1 Isolierung genomischer DNA aus Endothelzellen

Zur Isolierung genomischer DNA wurden die adhätierenden Zellen (jeweils  $5 \times 10^6$ ) 2 x mit PBS gewaschen und durch anschließendes Behandeln mit Trypsin/EDTA abgelöst. Nach Aufnahme der Zellen in Kulturmedium wurden die Zellpellets durch Zentrifugation gesammelt (1200 upm, 5 Min, RT), 1 x mit PBS gewaschen und in Lösung-I resuspendiert. Dem Ansatz wurde Proteinase K (Endkonzentration 0,2 mg/ml) und SDS (Endkonzentration 0,4%) zugegeben und über Nacht bei 37°C und 4 upm inkubiert. Danach wurde das Lysat jeweils mit einem Volumen Lösung-II und Phenol gemischt, eine Stunde bei 37°C und 4 upm inkubiert, ehe die wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt wurde. Nachfolgend wurde die isolierte DNA insgesamt 3 x mit einem Volumen Phenol, 1 x mit 1 Volumen Phenol/Chloroform und zum Schluss mit 1 Volumen Chloroform gemischt und jeweils 1 Stunde bei 37°C und 4 upm inkubiert.

Lösung-I:

NaCl	150 mM
EDTA	10 mM
Tris pH 7,5	10 mM

Lösung-II:

NaCl	650 mM
EDTA	10 mM
Tris pH 8,0	10 mM

**5.2.5.2 Fällung der genomischen DNA mit Ethanol**

DNA lässt sich aus wässrigen Salzlösungen durch Zugabe von Ethanol ausfällen. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) und 2 Volumen 100% Ethanol gemischt und über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Um Salz-Verunreinigungen zu entfernen, wurde das Präzipitat 2 x mit 70%igem Ethanol und 2 x mit 100%igem Ethanol gewaschen und anschließend in einem geeignetem Volumen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  resuspendiert.

**5.2.5.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Diese Art der Konzentrationsbestimmung wird durch das Absorptionsmaximum der aromatischen Systeme der Nukleinsäuren im kurzwelligen UV-Licht bei 260 nm ermöglicht. Für wässrige DNA-Lösungen in Quarzküvetten einer Schichtdicke von 1 cm gilt näherungsweise:

Konzentration ds DNA ( $\mu\text{g/ml}$ ) =  $\text{Abs.}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Konzentration ss DNA und RNA ( $\mu\text{g/ml}$ ) =  $\text{Abs.}_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm gilt als Maß der Reinheit der Nukleinsäurelösung und sollte den Wert 1,8 nicht unterschreiten.

#### 5.2.5.4 Nichtdenaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihres Molekulargewichtes wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Die Agarosekonzentration betrug meist 1%, womit lineare Moleküle effizient im Bereich von 0,2 – 10 kb aufgetrennt werden konnten. Zur Auftrennung kurzkettiger RNA-Fragmente wurde für die RT-PCR ein 2%iges Gel verwendet. Als Elektrolyt wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. Die Agarose wurde in der gewünschten Konzentration in 1 x TAE-Puffer gegeben und durch Aufkochen vollständig geschmolzen. Nach Abkühlen der Lösung auf 60°C wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) zugegeben. Anschließend wurde das Gel gegossen und nach dem Erstarren mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Die Probe wurde mit 6 x Auftragspuffer versetzt und aufgetragen. Anhand der Farbmarker wurde der Lauf verfolgt. Bromphenolblau verhält sich in 1%igen Gelen beim Lauf wie ein DNA-Fragment von ca. 0,6 kb Größe. Die Elektrophorese wurde je nach dem gewünschten Trenneffekt 30 Min bis 2 Std. bei einer Spannung von 5 - 10 V/cm durchgeführt. Nach dem Lauf wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht (254 nm) nachgewiesen und fotografiert.

##### 50 x TAE-Puffer:

Tris	2,0 M
Eisessig	1,0 M
EDTA	0,1 M
ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	

##### 6 x DNA-Auftragspuffer:

Bromphenolblau (Farbmarker)	0,25%
Xylen-Cyanol (Farbmarker)	0,25%
Sucrose	40,0%

#### 5.2.5.5 Synthetische Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden als Primer für die Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt. Sie wurden von Herrn Linzner (AG-Bio DV, IEG, GSF, Neuherberg) hergestellt.

Tab. 5.4: Primersequenzen für PCR.

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Gen	T <sub>Hyb</sub> [°C]
GAG-Gen 5'Primer	GGGCCAGACTGTTACCACTCCC	pBabePuro	52
GAG-Gen 3'Primer	CGAGGCGGGGTCGAACGAGGAG	pBabePuro	52
<i>Antisense</i> -GBP-1	TTGAAACAACACTGACTGAG AAGA	GBP-1	52
MMP-1 5'Primer	Die Sequenzen der Gen-spezifischen Primer für die RT-PCR waren dieselben, die für die <i>Makroarray</i> Membran [Atlas™ Human 1.2 Array (Clontech)] eingesetzt wurden. Aufgrund der Kaufvereinbarung können die Sequenzen nicht veröffentlicht werden.	MMP-1	
MMP-1 3'Primer		MMP-1	
MMP-2 5'Primer		MMP-2	
MMP-2 3'Primer		MMP-2	
MT1-MMP 5'Primer		MT1-MMP	
MT1-MMP 3'Primer		MT1-MMP	
GAPDH 5'Primer	AGCCACATCGCTCAGAACAC	GAPDH	57
GAPDH 3'Primer	GTTCTAGTAGTCGTTACGGAG	GAPDH	57
MMP-1 5'Primer Genomisch	CGAACAGCCATCAGGTGCGC	MMP-1 Genomisch	60
MMP-1 3'Primer Genomisch	CTCCGCTTTTCAACTTGCCTCCC	MMP-1 Genomisch	60

T<sub>Hyb</sub> = Für die PCR verwendete Hybridisierungstemperatur der Primer

### 5.2.5.6 Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wurde zum Nachweis von MMP-1, MMP-2, MT1-MMP und GAPDH-mRNA eingesetzt. Hierzu wurden 1 µg gesamtzelluläre RNA in eine reverse Transkription mit 0,5 µg Oligo-dT<sub>15</sub>-Primer (Promega) und 15 Units AMV-Reverse Transkriptase (Promega) eingesetzt (10 Min RT, 1 Std. 42°C, 10 Min 95°C). Die nachfolgende PCR wurde mit 0,4 U DyNAzyme I [Finnazymes (Espoo, FI)] als DNA-Polymerase unter Zusatz der MMP-Primer oder GAPDH-Primer in einer Konzentration von jeweils 5 pM in einem Reaktionsvolumen von 25 µl durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde einem Ansatz keine cDNA zugesetzt. Anschließend wurden die PCR-Produkte in einem 2%igen Agarosegel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt, unter UV-Licht nachgewiesen und fotografiert.

#### Amplifikationsreaktion:

**Tabelle 5.5: Für alle Primerpaare ausgewähltes PCR-Programm**

Denaturierung	2 Min	94°C	1 Zyklus
---------------	-------	------	----------

Denaturierung	20 Sek	94°C	10 Zyklen
Hybridisierung	30 Sek	52°C	
Synthese	45 Sek	68°C	

Denaturierung	30 Sek	94°C	15 Zyklen
Hybridisierung	30 Sek	52°C	
Synthese	45 Sek	68°C	

letzte Synthese	7 Min	68°C	1 Zyklus
-----------------	-------	------	----------



### 5.2.5.7 Polymerasekettenreaktion (PCR) der genomischen DNA

Für die nachfolgende Sequenzierung (GATC Biotech, Konstanz) des MMP-1 Promotors, wurde zunächst die kodierende DNA mittels PCR amplifiziert.

#### Standard-Ansatz:

100 ng	genomische DNA
25 µl	Promega <i>Mastermix</i>
2 µl	Primer 1 (10 pM)
2 µl	Primer 2 (10 pM)
x µl	H <sub>2</sub> O (Gesamtvolumen 50 µl)

#### Amplifikationsreaktion:

**Tabelle 5.6: Ausgewähltes PCR-Programm.**

Denaturierung	7 Min	95°C	1 Zyklus
Denaturierung	30 Sek	94°C	35 Zyklen
Hybridisierung	30 Sek	60°C	
Synthese	60 Sek	72°C	
letzte Synthese	10 Min	72°C	1 Zyklus

Die ermittelte Sequenz des MMP-1-Promotors wurde mit der publizierten Sequenz von MMP-1 verglichen. Dazu wurde das Programm BLAST Sequenz Viewer benutzt.

### 5.2.5.8 Analyse des Methylierungsstatus der genomischen DNA

Für die nachfolgende Untersuchung des Methylierungsstatus der DNA (Epigenomics AG, Berlin), wurde zunächst von zwei Donoren der HIV-1 und einem Donor der N-

Gruppe genomische DNA aus HUVEC isoliert (5.2.5.1 Isolierung genomischer DNA aus Endothelzellen).

Die Ermittlung des Methylierungsmusters erfolgte nach der Bisulfit-Methode (Frommer *et al.*, 1992). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Desaminierung von Cytosin zu Uracil durch Behandlung der DNA mit Bisulfit. Methyliertes Cytosin wird durch Desaminierung zu Thymin. In der folgenden genomischen Sequenzierung der DNA erscheint methyliertes Cytosin als Thymin, nicht-methyliertes Cytosin wird weiterhin als Cytosin erkannt.

## **5.2.6 RNA-Technologie**

### **5.2.6.1 Isolierung gesamtzellulärer RNA aus eukaryontischen Zellen**

Die RNA-Isolierung wurde mit dem *RNeasy-Mini-Kit* (Qiagen) zur Isolierung von maximal 100 µg RNA bzw. mit dem *RNeasy-Midi-Kit* (Qiagen) zur Isolierung von bis zu 1 mg RNA dem Herstellerprotokoll entsprechend durchgeführt.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1200 upm, 10 Min, RT) sedimentiert und pro  $5 \times 10^5$  Zellen 700 µl RLT-Puffer (beinhaltet Guanidinthiocyanat und  $\beta$ -Mercaptoethanol) zugegeben und das Zellpellet vollständig resuspendiert. Zur vollständigen Homogenisation wurde die Probe durch eine *Shredder*-Säule (Mini-Kit) zentrifugiert. Das homogenisierte Lysat wurde mit einem Volumenanteil 70%igem Ethanol versetzt, auf eine Säule aufgetragen und zentrifugiert. Die Gesamt-RNA ist an die Membran der Säule gebunden. Nach mehrfachem Waschen, erfolgte die Elution mit RNase-freiem Wasser.

### **5.2.6.2 DNase Behandlung der gesamtzellulären RNA**

Um eine DNA-Kontamination der gesamtzellulären RNA zu vermeiden, wurde diese mit DNase I behandelt. Dazu wurde jede Probe mit

100 µl	gesamtzelluläre RNA (1 µg/100 µl)
20 µl	10 x DNase I Puffer
5 µl	DNase I (RNase frei, 1 Unit/µl, Clontech)

75 µl            H<sub>2</sub>O

für 30 Min bei 37°C inkubiert, die Reaktion mit 20 µl Stopmix (0,1 M EDTA, pH 8,0; 1mg/ml Glykogen) beendet und die RNA mit Phenol/Chloroform aufgereinigt.

#### **5.2.6.3 Phenol/Chloroform-Behandlung und Fällung der RNA**

Zu jeder RNA-Probe wurde ein Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; pH 4,5) zugegeben, gründlich gemischt und zur Trennung der Phasen zentrifugiert (14000 upm, 10 Min bei 4°C). Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und mit einem Volumen Chloroform gründlich gemischt. Danach wurden die Phasen mittels Zentrifugation getrennt und die wässrige Phase erneut in ein neues Gefäß überführt.

#### **5.2.6.4 Fällung der RNA**

Die RNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 2 M Natriumacetat (pH 4,5) und 2,5 Volumen 95%igem Ethanol gemischt und über Nacht bei –80°C gefällt. Nach der anschließenden Zentrifugation (14000 upm, 30 Min bei 4°C) wurde der Ethanol dekantiert und das Pellet einmal mit 500 µl 80%igem Ethanol gewaschen, um Salz-Verunreinigungen zu entfernen. Das RNA-Pellet wurde bei RT getrocknet und in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgenommen.

#### **5.2.6.5 Nichtdenaturierende Elektrophorese von RNA**

Um die Intaktheit von RNA-Präparationen zu kontrollieren, wurde die RNA in einem nichtdenaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Unter nichtdenaturierenden Bedingungen ist das Laufverhalten der RNA von ihrer Größe und ihrer Sekundärstruktur abhängig. Hierzu wurden 2 µl RNA mit 2 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> und 2 µl RNA-Auftragspuffer vermischt und der Ansatz auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer (5.2.6.4) verwendet. Die RNA wurde mit Ethidiumbromid gefärbt.

RNA-Auftragspuffer:

Bromphenolblaulösung (0,5%)	0,5 ml
Ficoll	1,25 g
ad 5 ml H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	

**5.2.6.6 Herstellen einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde**

Die Herstellung der Sonde erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Dazu wurde pro Probe folgender Ansatz (Ansatz 1) gemischt und bei RT inkubiert:

5 x Reaktionspuffer	2 µl
10 x dNTP Mix	1 µl
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dATP (3000Ci/mmol, 10 µCi/µl)	3,5 µl
Reverse Transkriptase	1 µl

pro RNA-Probe:

4-5 µg RNA	2 µl
Primer-Mix für Atlas Membran (Clontech)	1 µl

gemischt und zunächst bei 70°C, dann nochmals bei 50°C, jeweils für 2 Min inkubiert. Danach wurden beide Reaktionsansätze gemischt und bei 50°C für 25 Min inkubiert, ehe 1 µl 10 x Terminationsmix zugegeben wurde.

**5.2.6.7 Reinigung der radioaktiv markierten Sonden**

Vor der Hybridisierung wurden nicht eingebaute dNTPs in einem Reinigungsschritt abgetrennt. Für die Reinigung wurden *NucleoSpin Extraction Spin* Säulen (Clontech) eingesetzt.

Dazu wurden zu jeder Probe 190 µl Puffer NT2 zugegeben, zentrifugiert (14000 x upm, 1 Minute bei RT) und die Säule in ein neues Gefäß überführt. Die radioaktiv markierte Sonde wurde dreimal mit 400 µl Puffer NT3 gewaschen und zentrifugiert (14000 x upm, 1 Minute bei RT). Danach wurde die Sonde mit 100 µl Puffer NE eluiert, gemessen und die eingebaute Radioaktivität gemessen.

#### 5.2.6.8 Bestimmung der spezifischen Aktivität radioaktiv markierter cDNA

Nach der Reinigung wurde 1 µl der cDNA-haltigen Lösung entnommen, mit 10 ml Szintillationslösung gemischt und im Szintillationszähler die Zerfälle pro Minute (cpm) gemessen. Radioaktiv markierte cDNA-Fragmente, die eine spezifische Aktivität von mehr als  $5 \times 10^6$  cpm/Probe aufwiesen, wurden für die Hybridisierung eingesetzt.

#### 5.2.6.9 cDNA Hybridisierung der Atlas Membran (Clontech, Atlas™ Human 1.2 Array)

Pro Membran wurde

5 ml Hybridisierungslösung (*ExpressHyb*, Clontech) auf 68°C erhitzt  
0,5 mg sonifiziertes Lachssperma bei 100°C für 5 Min denaturiert, auf Eis abgekühlt; beide Lösungen wurden gemischt und bei 68°C inkubiert.

Zur Denaturierung der Sonden wurden

radioaktiv markierte Sonde (abgegliche Aktivität, mindestens $5 \times 10^6$ cpm/Probe )	100 µl
10 x Denaturierungslösung (1M NaOH, 10 mM EDTA)	11 µl
gemischt und für 20 Min bei 68°C inkubiert	

danach erfolgte die Zugabe von

C <sub>0</sub> t-1 DNA (repetitive DNA-Sequenzen)	5 µl
2 x Neutralisierungslösung (1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0)	115 µl

der Ansatz wurde bei 68°C für 10 Min inkubiert und anschließend die jeweilige Atlas-Membran über Nacht bei 68°C hybridisiert.

Die Membranen wurden viermal jeweils für 30 Min mit vorgewärmter Waschlösung 1 (2 x SSC, 1% SDS) und einmal mit Waschlösung 2 (0,1 x SSC, 0,5% SDS) bei 68°C gewaschen. Zuletzt wurden die Membranen für 5 Min mit 2 x SSC bei RT gewaschen, ehe sie auf einen Röntgenfilm (Kodak) aufgebracht und zwischen ein und fünf Tage exponiert wurden.

Waschlösung 1:

20 x SSC	100 ml
10% SDS	100 ml
ad 2 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	

Waschlösung 2:

20 x SSC	5 ml
10% SDS	50 ml
ad 2 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	

**5.2.6.10      *Strip-wash***

Zur Entfernung der spezifisch gebundenen radioaktiven Probe wurde die Membran nach der Autoradiographie 20 Min in 0,05% SDS für 10 Min gekocht und anschließend mit Waschlösung 1 (2 x SSC, 1% SDS) gewaschen. Um die Membranen vor austrocknen zu schützen, wurden sie in Folie eingeschweißt.

Waschpuffer 1:

20 x SSC	100 ml
10% SDS	100 ml
ad 2 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	

## 6 Literatur

Acevedo, M., Sprecher, D. L., Calabrese, L., Pearce, G. L., Coyner, D. L., Halliburton, S. S., White, R. D., Sykora, E., Kondos, G. T., and Hoff, J. A. (2002). Pilot study of coronary atherosclerotic risk and plaque burden in HIV patients: 'a call for cardiovascular prevention'. *Atherosclerosis* 163, 349-354.

Ackerman, A. B. (1979). Subtle clues to diagnosis by conventional microscopy. The patch stage of Kaposi's sarcoma. *Am J Dermatopathol* 1, 165-172.

Aiello, L. P., Avery, R. L., Arrigg, P. G., Keyt, B. A., Jampel, H. D., Shah, S. T., Pasquale, L. R., Thieme, H., Iwamoto, M. A., Park, J. E., and et al. (1994). Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 331, 1480-1487.

Albini, A., Soldi, R., Giunciuglio, D., Giraudo, E., Benelli, R., Primo, L., Noonan, D., Salio, M., Camussi, G., Rockl, W., and Bussolino, F. (1996). The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells. *Nat Med* 2, 1371-1375.

Ardehali, A., Laks, H., Drinkwater, D. C., Ziv, E., and Drake, T. A. (1995). Vascular cell adhesion molecule-1 is induced on vascular endothelia and medial smooth muscle cells in experimental cardiac allograft vasculopathy. *Circulation* 92, 450-456.

Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M., and Isner, J. M. (1999a). Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85, 221-228.

Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J. M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-967.

Asahara, T., Takahashi, T., Masuda, H., Kalka, C., Chen, D., Iwaguro, H., Inai, Y., Silver, M., and Isner, J. M. (1999). VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J* 18, 3964-3972.

Ascherl, G., Hohenadl, C., Schatz, O., Shumay, E., Bogner, J., Eckhart, L., Tschachler, E., Monini, P., Ensoli, B., and Stürzl, M. (1999). Infection with human immunodeficiency virus-1 increases expression of vascular endothelial cell growth factor in T cells: implications for acquired immunodeficiency syndrome-associated vasculopathy. *Blood* 93, 4232-4241.

Ascherl, G., Sgadari, C., Bugarini, R., Bogner, J., Schatz, O., Ensoli, B., and Stürzl, M. (2001). Serum concentrations of fibroblast growth factor 2 are increased in HIV type 1-infected patients and inversely related to survival probability. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17, 1035-1039.

Banerji, S., Ni, J., Wang, S. X., Clasper, S., Su, J., Tammi, R., Jones, M., and Jackson, D. G. (1999). LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 144, 789-801.

Barbara, N. P., Wrana, J. L., and Letarte, M. (1999). Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem* 274, 584-594.

Barbaro, G. (2002). Cardiovascular manifestations of HIV infection. *Circulation* 106, 1420-1425.

Barbaro, G. (2003). Pathogenesis of HIV-associated heart disease. *Aids* 17 Suppl 1, S12-20.

Barillari, G., Sgadari, C., Fiorelli, V., Samaniego, F., Colombini, S., Manzari, V., Modesti, A., Nair, B. C., Cafaro, A., Sturzl, M., and Ensoli, B. (1999). The Tat protein of human immunodeficiency virus type-1 promotes vascular cell growth and locomotion by engaging the  $\alpha 5 \beta 1$  and  $\alpha v \beta 3$  integrins and by mobilizing sequestered basic fibroblast growth factor. *Blood* 94, 663-672.

Barker, D. J., Osmond, C., Golding, J., Kuh, D., and Wadsworth, M. E. (1989). Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *Bmj* 298, 564-567.

Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautuet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and



Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871.

Beekhuizen, H., and van Furth, R. (1994). Growth characteristics of cultured human macrovascular venous and arterial and microvascular endothelial cells. *J Vasc Res* 31, 230-239.

Betsholtz, C., Johnsson, A., Heldin, C. H., Westermark, B., Lind, P., Urdea, M. S., Eddy, R., Shows, T. B., Philpott, K., Mellor, A. L., and et al. (1986). cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumour cell lines. *Nature* 320, 695-699.

Bevilacqua, M. P., Stengelin, S., Gimbrone, M. A., Jr., and Seed, B. (1989). Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243, 1160-1165.

Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G., and Rifkin, D. B. (1997). Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev* 18, 26-45.

Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16, 6-21.

Bochner, B. S., Luscinskas, F. W., Gimbrone, M. A., Jr., Newman, W., Sterbinsky, S. A., Derse-Anthony, C. P., Klunk, D., and Schleimer, R. P. (1991). Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med* 173, 1553-1557.

Brauchle, M., Gluck, D., Di Padova, F., Han, J., and Gram, H. (2000). Independent role of p38 and ERK1/2 mitogen-activated kinases in the upregulation of matrix metalloproteinase-1. *Exp Cell Res* 258, 135-144.

Breen, E. C. (2002). Pro- and anti-inflammatory cytokines in human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacol Ther* 95, 295-304.

Brinckerhoff, C. E., Rutter, J. L., and Benbow, U. (2000). Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res* 6, 4823-4830.

Browning, P. J., Sechler, J. M., Kaplan, M., Washington, R. H., Gendelman, R., Yarchoan, R., Ensoli, B., and Gallo, R. C. (1994). Identification and culture of Kaposi's sarcoma-like spindle cells from the peripheral blood of human immunodeficiency virus-1-infected individuals and normal controls. *Blood* 84, 2711-2720.

Burrows, F. J., Derbyshire, E. J., Tazzari, P. L., Amlot, P., Gazdar, A. F., King, S. W., Letarte, M., Vitetta, E. S., and Thorpe, P. E. (1995). Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* 1, 1623-1634.

Bussolino, F., Mantovani, A., and Persico, G. (1997). Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem Sci* 22, 251-256.

Calabrese, L. H., Estes, M., Yen-Lieberman, B., Proffitt, M. R., Tubbs, R., Fishleder, A. J., and Levin, K. H. (1989). Systemic vasculitis in association with human immunodeficiency virus infection. *Arthritis Rheum* 32, 569-576.

Carlos, T., Kovach, N., Schwartz, B., Rosa, M., Newman, B., Wayner, E., Benjamin, C., Osborn, L., Lobb, R., and Harlan, J. (1991). Human monocytes bind to two cytokine-induced adhesive ligands on cultured human endothelial cells: endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1. *Blood* 77, 2266-2271.

Carmeliet, P. (2000a). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6, 389-395.

Carmeliet, P. (2000c). Developmental biology. One cell, two fates. *Nature* 408, 43-45.

Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., and Nagy, A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435-439.

Carmeliet, P., and Jain, R. K. (2000b). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.

Chang, H. C., Samaniego, F., Nair, B. C., Buonaguro, L., and Ensoli, B. (1997). HIV-1 Tat protein exits from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulfate proteoglycans through its basic region. *Aids* 11, 1421-1431.

Cheng, Y. S., Colonna, R. J., and Yin, F. H. (1983). Interferon induction of fibroblast proteins with guanylate binding activity. *J Biol Chem* 258, 7746-7750.

Chi, D., Henry, J., Kelley, J., Thorpe, R., Smith, J. K., and Krishnaswamy, G. (2000). The effects of HIV infection on endothelial function. *Endothelium* 7, 223-242.

Chicoine, E., Esteve, P. O., Robledo, O., Van Themsche, C., Potworowski, E. F., and St-Pierre, Y. (2002). Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 297, 765-772.

Cleaver, O., and Melton, D. A. (2003). Endothelial signaling during development. *Nat Med* 9, 661-668.

Clerici, M., Saresella, M., Colombo, F., Fossati, S., Sala, N., Bricalli, D., Villa, M. L., Ferrante, P., Dally, L., and Vigano, A. (2000). T-lymphocyte maturation abnormalities in uninfected newborns and children with vertical exposure to HIV. *Blood* 96, 3866-3871.

Clerici, M., Sison, A. V., Berzofsky, J. A., Rakusan, T. A., Brandt, C. D., Ellaurie, M., Villa, M., Colie, C., Venzon, D. J., Sever, J. L., and et al. (1993). Cellular immune factors associated with mother-to-infant transmission of HIV. *Aids* 7, 1427-1433.

Cohen, J. (1999). Cheap treatment cuts HIV transmission. *Science* 283, 916-917.

Cornali, E., Zietz, C., Benelli, R., Weninger, W., Masiello, L., Breier, G., Tschachler, E., Albin, A., and Stürzl, M. (1996). Vascular endothelial growth factor regulates angiogenesis and vascular permeability in Kaposi's sarcoma. *Am J Pathol* 149, 1851-1869.

Crawford, H. C., and Matrisian, L. M. (1996). Mechanisms controlling the transcription of matrix metalloproteinase genes in normal and neoplastic cells. *Enzyme Protein* 49, 20-37.

Creemers, E. E., Cleutjens, J. P., Smits, J. F., and Daemen, M. J. (2001). Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 89, 201-210.

Davison, P. M., Bensch, K., and Karasek, M. A. (1983). Isolation and long-term serial cultivation of endothelial cells from the microvessels of the adult human dermis. *In Vitro* 19, 937-945.

Delia, D., Lampugnani, M. G., Resnati, M., Dejana, E., Aiello, A., Fontanella, E., Soligo, D., Pierotti, M. A., and Greaves, M. F. (1993). CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. *Blood* 81, 1001-1008.

Denis, C. V. (2002). Molecular and cellular biology of von Willebrand factor. *Int J Hematol* 75, 3-8.

Desai, S. B., and Libutti, S. K. (1999). Tumor angiogenesis and endothelial cell modulatory factors. *J Immunother* 22, 186-211.

Dhawan, S., Puri, R. K., Kumar, A., Duplan, H., Masson, J. M., and Aggarwal, B. B. (1997). Human immunodeficiency virus-1-tat protein induces the cell surface expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 in human endothelial cells. *Blood* 90, 1535-1544.

Distler, O., Neidhart, M., Gay, R. E., and Gay, S. (2002). The molecular control of angiogenesis. *Int Rev Immunol* 21, 33-49.

Drews, U. (1993). *Taschenatlas der Embryologie*. Georg Thieme Verlag.

Duff, S. E., Li, C., Garland, J. M., and Kumar, S. (2003). CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *Faseb J* 17, 984-992.

Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2, 161-174.

Ensoli, B., Sgadari, C., Barillari, G., Sirianni, M. C., Stürzl, M., and Monini, P. (2001). Biology of Kaposi's sarcoma. *Eur J Cancer* 37, 1251-1269.

Erices, A., Conget, P., and Minguell, J. J. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 109, 235-242.

Esser, S., Wolburg, K., Wolburg, H., Breier, G., Kurzchalia, T., and Risau, W. (1998). Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol* 140, 947-959.

Fackler, M. J., Krause, D. S., Smith, O. M., Civin, C. I., and May, W. S. (1995). Full-length but not truncated CD34 inhibits hematopoietic cell differentiation of M1 cells. *Blood* 85, 3040-3047.

Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., Powell-Braxton, L., Hillan, K. J., and Moore, M. W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439-442.

Fina, L., Molgaard, H. V., Robertson, D., Bradley, N. J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D. R., Baker, M. A., and Greaves, M. F. (1990). Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75, 2417-2426.

Findlay, J. K. (1986). Angiogenesis in reproductive tissues. *J Endocrinol* 111, 357-366.

Fiorelli, V., Gendelman, R., Sirianni, M. C., Chang, H. K., Colombini, S., Markham, P. D., Monini, P., Sonnabend, J., Pintus, A., Gallo, R. C., and Ensoli, B. (1998). gamma-Interferon produced by CD8<sup>+</sup> T cells infiltrating Kaposi's sarcoma induces spindle cells with angiogenic phenotype and synergy with human immunodeficiency virus-1 Tat protein: an immune response to human herpesvirus-8 infection? *Blood* 91, 956-967.

Fisher, K. L., Lu, J., Riddle, L., Kim, K. J., Presta, L. G., and Bodary, S. C. (1997). Identification of the binding site in intercellular adhesion molecule 1 for its receptor, leukocyte function-associated antigen 1. *Mol Biol Cell* 8, 501-515.

Flamme, I., and Risau, W. (1992). Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development* 116, 435-439.

Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1, 27-31.

Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., Molloy, P. L., and Paul, C. L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1827-1831.

Fujimoto, T., Parry, S., Urbanek, M., Sammel, M., Macones, G., Kuivaniemi, H., Romero, R., and Strauss, J. F., 3rd (2002). A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter influences amnion cell MMP-1 expression and risk for preterm premature rupture of the fetal membranes. *J Biol Chem* 277, 6296-6302.

Gallery, E. D., Campbell, S., Arkell, J., Nguyen, M., and Jackson, C. J. (1999). Preeclamptic decidual microvascular endothelial cells express lower levels of matrix metalloproteinase-1 than normals. *Microvasc Res* 57, 340-346.

Gallo, R. C., Sarin, P. S., Gelmann, E. P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V. S., Mann, D., Sidhu, G. D., Stahl, R. E., Zolla-Pazner, S., Leibowitch, J., and Popovic, M. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 865-867.

Garlanda, C., and Dejana, E. (1997). Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 1193-1202.

Gehling, U. M., Ergun, S., Schumacher, U., Wagener, C., Pantel, K., Otte, M., Schuch, G., Schafhausen, P., Mende, T., Kilic, N., Kluge, K., Schafer, B., Hossfeld, D. K., and Fiedler, W. (2000). In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95, 3106-3112.

Gerber, H. P., Dixit, V., and Ferrara, N. (1998). Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 273, 13313-13316.

Ghilardi, G., Biondi, M. L., Mangoni, J., Leviti, S., DeMonti, M., Guagnellini, E., and Scorza, R. (2001). Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism 1G/2G is correlated with colorectal cancer invasiveness. *Clin Cancer Res* 7, 2344-2346.

Gill, M., Dias, S., Hattori, K., Rivera, M. L., Hicklin, D., Witte, L., Girardi, L., Yurt, R., Himel, H., and Rafii, S. (2001). Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res* 88, 167-174.

Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K., and Brown, M. S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 333-337.

Gonzalez-Crussi, F. (1971). Vasculogenesis in the chick embryo. An ultrastructural study. *Am J Anat* 130, 441-460.

Gospodarowicz, D. (1990). Fibroblast growth factor. Chemical structure and biologic function. *Clin Orthop*, 231-248.

Gougos, A., and Letarte, M. (1988). Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol* 141, 1925-1933.

Grant, D. S., Kleinman, H. K., Leblond, C. P., Inoue, S., Chung, A. E., and Martin, G. R. (1985). The basement-membrane-like matrix of the mouse EHS tumor: II. Immunohistochemical quantitation of six of its components. *Am J Anat* 174, 387-398.

Griffioen, A. W., and Molema, G. (2000). Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev* 52, 237-268.

Griggs, J., Skepper, J. N., Smith, G. A., Brindle, K. M., Metcalfe, J. C., and Hesketh, R. (2002). Inhibition of proliferative retinopathy by the anti-vascular agent combretastatin-A4. *Am J Pathol* 160, 1097-1103.

Guenzi, E., Töpolc, K., Cornali, E., Lubeseder-Martellato, C., Jörg, A., Matzen, K., Zietz, C., Kremmer, E., Nappi, F., Schwemmle, M., Hohenadl, C., Barillari, G.,

Tschachler, E., Monini, P., Ensoli, B., and Stürzl, M. (2001). The helical domain of GBP-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation by inflammatory cytokines. *Embo J* 20, 5568-5577.

Guenzi, E., Töpol, K., Lubeseder-Martellato, C., Jörg, A., Naschberger, E., Benelli, R., Albini, A., and Stürzl, M. (2003). The guanylate binding protein-1 GTPase controls the invasive and angiogenic capability of endothelial cells through inhibition of MMP-1 expression. *Embo J* 22, 3772-3782.

Haraldsen, G., Kvale, D., Lien, B., Farstad, I. N., and Brandtzaeg, P. (1996). Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells. *J Immunol* 156, 2558-2565.

Haritopoulos, K. N., Lazaris, A. C., Kavantzias, N., Tseleni-Balafouta, S., Thomopoulou, G., and Aroni, K. (2003). ICAM-1 and beta(3) integrin immunoexpression in malignant melanoma cells: can they be used as additional predictors? *Apmis* 111, 421-429.

Hattori, K., Heissig, B., Wu, Y., Dias, S., Tejada, R., Ferris, B., Hicklin, D. J., Zhu, Z., Bohlen, P., Witte, L., Hendrikx, J., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Moore, M. A., Werb, Z., Lyden, D., and Rafii, S. (2002). Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med* 8, 841-849.

Haverkos, H. W., and Drotman, D. P. (1985). The epidemiology of the acquired immunodeficiency syndrome. *Front Radiat Ther Oncol* 19, 8-13.

Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Besmer, P., Lyden, D., Moore, M. A., Werb, Z., and Rafii, S. (2002). Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109, 625-637.

Hengge, U. R., Ruzicka, T., Tying, S. K., Stuschke, M., Roggendorf, M., Schwartz, R. A., and Seeber, S. (2002). Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestations, and therapy. *Lancet Infect Dis* 2, 281-292.



Hengge, U. R., Ruzicka, T., Tying, S. K., Stuschke, M., Roggendorf, M., Schwartz, R. A., and Seeber, S. (2002a). Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 2: pathogenesis, Castleman's disease, and pleural effusion lymphoma. *Lancet Infect Dis* 2, 344-352.

His, W. (1900). Lecithoblast und Angioblast der Wirbeltiere. *Abhandl KS Ges Wiss Math-Phys* 22, 171-328.

Hofman, F. M., Wright, A. D., Dohadwala, M. M., Wong-Staal, F., and Walker, S. M. (1993). Exogenous tat protein activates human endothelial cells. *Blood* 82, 2774-2780.

Howard, R. B., Hosokawa, T., and Maguire, M. H. (1987). Hypoxia-induced fetoplacental vasoconstriction in perfused human placental cotyledons. *Am J Obstet Gynecol* 157, 1261-1266.

Huang, L., Li, C. J., and Pardee, A. B. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 TAT protein activates B lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 237, 461-464.

Hubbard, A. K., and Rothlein, R. (2000). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med* 28, 1379-1386.

Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., and Minick, C. R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52, 2745-2756.

Joukov, V., Kaipainen, A., Jeltsch, M., Pajusola, K., Olofsson, B., Kumar, V., Eriksson, U., and Alitalo, K. (1997). Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C. *J Cell Physiol* 173, 211-215.

Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Gordon, R., Tepper, O., Gravereaux, E., Pieczek, A., Iwaguro, H., Hayashi, S. I., Isner, J. M., and Asahara, T. (2000). Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res* 86, 1198-1202.

Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka-Moll, W. M., Silver, M., Kearney, M., Li, T., Isner, J. M., and Asahara, T. (2000a). Transplantation of ex vivo expanded

endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3422-3427.

Keck, P. J., Hauser, S. D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J., and Connolly, D. T. (1989). Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246, 1309-1312.

Keyszer, G., Lambiri, I., Keysser, M., Keysser, C., Nagel, R., Burmester, G. R., and Jung, K. (1998). Matrix metalloproteinases, but not cathepsins B, H, and L or their inhibitors in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis are potentially useful markers of disease activity. *Z Rheumatol* 57, 392-398.

Kind, C., Rudin, C., Siegrist, C. A., Wyler, C. A., Biedermann, K., Lauper, U., Irion, O., Schupbach, J., and Nadal, D. (1998). Prevention of vertical HIV transmission: additive protective effect of elective Cesarean section and zidovudine prophylaxis. Swiss Neonatal HIV Study Group. *Aids* 12, 205-210.

Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Hassell, J. R., Star, V. L., Cannon, F. B., Laurie, G. W., and Martin, G. R. (1986). Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* 25, 312-318.

Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Liotta, L. A., Robey, P. G., Tryggvason, K., and Martin, G. R. (1982). Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 21, 6188-6193.

Klimiuk, P. A., Sierakowski, S., Latosiewicz, R., Cylwik, B., Skowronski, J., and Chwiecko, J. (2002). Serum matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in different histological variants of rheumatoid synovitis. *Rheumatology (Oxford)* 41, 78-87.

Kosano, H., Okano, T., Katsura, Y., Noritake, M., Kado, S., Matsuoka, T., and Nishigori, H. (1999). ProMMP-9 (92 kDa gelatinase) in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Life Sci* 64, 2307-2315.

Krause, D. S., Fackler, M. J., Civin, C. I., and May, W. S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87, 1-13.

Krause, D. S., Ito, T., Fackler, M. J., Smith, O. M., Collector, M. I., Sharkis, S. J., and May, W. S. (1994). Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 84, 691-701.

Kubota, Y., Kleinman, H. K., Martin, G. R., and Lawley, T. J. (1988). Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol* 107, 1589-1598.

Kuhn, L., Coutoudis, A., Moodley, D., Trabattoni, D., Mngqundaniso, N., Shearer, G. M., Clerici, M., Coovadia, H. M., and Stein, Z. (2001). T-helper cell responses to HIV envelope peptides in cord blood: protection against intrapartum and breast-feeding transmission. *Aids* 15, 1-9.

Lafleur, M. A., Hollenberg, M. D., Atkinson, S. J., Knauper, V., Murphy, G., and Edwards, D. R. (2001). Activation of pro-(matrix metalloproteinase-2) (pro-MMP-2) by thrombin is membrane-type-MMP-dependent in human umbilical vein endothelial cells and generates a distinct 63 kDa active species. *Biochem J* 357, 107-115.

Lafrenie, R. M., Wahl, L. M., Epstein, J. S., Hewlett, I. K., Yamada, K. M., and Dhawan, S. (1996a). HIV-1-Tat modulates the function of monocytes and alters their interactions with microvessel endothelial cells. A mechanism of HIV pathogenesis. *J Immunol* 156, 1638-1645.

Lafrenie, R. M., Wahl, L. M., Epstein, J. S., Yamada, K. M., and Dhawan, S. (1997). Activation of monocytes by HIV-Tat treatment is mediated by cytokine expression. *J Immunol* 159, 4077-4083.

Lallemant, M., Jourdain, G., Le Coeur, S., Kim, S., Koetsawang, S., Comeau, A. M., Phoolcharoen, W., Essex, M., McIntosh, K., and Vithayasai, V. (2000). A trial of shortened zidovudine regimens to prevent mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. Perinatal HIV Prevention Trial (Thailand) Investigators. *N Engl J Med* 343, 982-991.

Langley, R. R., Carlisle, R., Ma, L., Specian, R. D., Gerritsen, M. E., and Granger, D. N. (2001). Endothelial expression of vascular cell adhesion molecule-1 correlates with metastatic pattern in spontaneous melanoma. *Microcirculation* 8, 335-345.

Langston, C., Cooper, E. R., Goldfarb, J., Easley, K. A., Husak, S., Sunkle, S., Starc, T. J., and Colin, A. A. (2001). Human immunodeficiency virus-related mortality in infants and children: data from the pediatric pulmonary and cardiovascular complications of vertically transmitted HIV (P(2)C(2)) Study. *Pediatrics* 107, 328-338.

Lee, O. K., Kuo, T. K., Chen, W. M., Lee, K. D., Hsieh, S. L., and Chen, T. H. (2003). Isolation of multi-potent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*.

Link, H., and Arseniev, L. (1997). CD34 positive blood cells for allogeneic progenitor and stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 26, 451-465.

Lipshultz, S. E., Easley, K. A., Orav, E. J., Kaplan, S., Starc, T. J., Bricker, J. T., Lai, W. W., Moodie, D. S., McIntosh, K., Schluchter, M. D., and Colan, S. D. (1998). Left ventricular structure and function in children infected with human immunodeficiency virus: the prospective P2C2 HIV Multicenter Study. Pediatric Pulmonary and Cardiac Complications of Vertically Transmitted HIV Infection (P2C2 HIV) Study Group. *Circulation* 97, 1246-1256.

Lipshultz, S. E., Easley, K. A., Orav, E. J., Kaplan, S., Starc, T. J., Bricker, J. T., Lai, W. W., Moodie, D. S., Sopko, G., Schluchter, M. D., and Colan, S. D. (2002). Cardiovascular status of infants and children of women infected with HIV-1 (P(2)C(2) HIV): a cohort study. *Lancet* 360, 368-373.

Lohela, M., Saaristo, A., Veikkola, T., and Alitalo, K. (2003). Lymphangiogenic growth factors, receptors and therapies. *Thromb Haemost* 90, 167-184.

Lubeseder-Martellato, C., Guenzi, E., Jörg, A., Töpol, K., Naschberger, E., Kremmer, E., Zietz, C., Tschachler, E., Hutzler, P., Schwemmle, M., Matzen, K., Grimm, T., Ensoli, B., and Stürzl, M. (2002). Guanylate-binding protein-1 expression is selectively induced by inflammatory cytokines and is an activation marker of endothelial cells during inflammatory diseases. *Am J Pathol* 161, 1749-1759.

Luttun, A., Tjwa, M., Moons, L., Wu, Y., Angelillo-Scherrer, A., Liao, F., Nagy, J. A., Hooper, A., Priller, J., De Klerck, B., Compennolle, V., Daci, E., Bohlen, P., Dewerchin, M., Herbert, J. M., Fava, R., Matthys, P., Carmeliet, G., Collen, D., Dvorak, H. F., Hicklin, D. J., and Carmeliet, P. (2002). Revascularization of ischemic

tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 8, 831-840.

Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L., Chadburn, A., Heissig, B., Marks, W., Witte, L., Wu, Y., Hicklin, D., Zhu, Z., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Moore, M. A., Hajjar, K. A., Manova, K., Benezra, R., and Rafii, S. (2001). Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 7, 1194-1201.

Maglione, D., Guerriero, V., Viglietto, G., Delli-Bovi, P., and Persico, M. G. (1991). Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9267-9271.

Mannucci, P. M. (1995). Platelet von Willebrand factor in inherited and acquired bleeding disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2428-2432.

Mauviel, A. (1993). Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem* 53, 288-295.

McNutt, N. S., Fletcher, V., and Conant, M. A. (1983). Early lesions of Kaposi's sarcoma in homosexual men. An ultrastructural comparison with other vascular proliferations in skin. *Am J Pathol* 111, 62-77.

Meng, H., Marchese, M. J., Garlick, J. A., Jelaska, A., Korn, J. H., Gailit, J., Clark, R. A., and Gruber, B. L. (1995). Mast cells induce T-cell adhesion to human fibroblasts by regulating intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 expression. *J Invest Dermatol* 105, 789-796.

Meyer, M., Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H. G., Ziche, M., Lanz, C., Buttner, M., Rziha, H. J., and Dehio, C. (1999). A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *Embo J* 18, 363-374.

Miller, A. D., Garcia, J. V., von Suhr, N., Lynch, C. M., Wilson, C., and Eiden, M. V. (1991). Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J Virol* 65, 2220-2224.

Montesano, R., Vassalli, J. D., Baird, A., Guillemin, R., and Orci, L. (1986). Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 7297-7301.

Morgenstern, J. P., and Land, H. (1990). Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* **18**, 3587-3596.

Moussa, M., Roques, P., Fievet, N., Menu, E., Maldonado-Estrada, J. G., Brunerie, J., Frydman, R., Fritel, X., Herve, F., and Chaouat, G. (2001). Placental cytokine and chemokine production in HIV-1-infected women: trophoblast cells show a different pattern compared to cells from HIV-negative women. *Clin Exp Immunol* **125**, 455-464.

Murohara, T., Ikeda, H., Duan, J., Shintani, S., Sasaki, K., Eguchi, H., Onitsuka, I., Matsui, K., and Imaizumi, T. (2000). Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* **105**, 1527-1536.

Nagase, H., and Woessner, J. F., Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* **274**, 21491-21494.

Nakada, M. T., Amin, K., Christofidou-Solomidou, M., O'Brien, C. D., Sun, J., Gurubhagavatula, I., Heavner, G. A., Taylor, A. H., Paddock, C., Sun, Q. H., Zehnder, J. L., Newman, P. J., Albelda, S. M., and DeLisser, H. M. (2000). Antibodies against the first Ig-like domain of human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) that inhibit PECAM-1-dependent homophilic adhesion block in vivo neutrophil recruitment. *J Immunol* **164**, 452-462.

Nelson, A. R., Fingleton, B., Rothenberg, M. L., and Matrisian, L. M. (2000). Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* **18**, 1135-1149.

Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., and Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* **13**, 9-22.

Neumann, T., Miller, M., Esser, S., Gerken, G., and Erbel, R. (2002). Atherosclerosis in HIV-positive patients. *Z Kardiol* **91**, 879-888.

Newberry, E. P., Willis, D., Latifi, T., Boudreaux, J. M., and Towler, D. A. (1997). Fibroblast growth factor receptor signaling activates the human interstitial collagenase promoter via the bipartite Ets-AP1 element. *Mol Endocrinol* 11, 1129-1144.

Newman, P. J. (1994). The role of PECAM-1 in vascular cell biology. *Ann N Y Acad Sci* 714, 165-174.

Nikkari, S. T., O'Brien, K. D., Ferguson, M., Hatsukami, T., Welgus, H. G., Alpers, C. E., and Clowes, A. W. (1995). Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. *Circulation* 92, 1393-1398.

Ogawa, S., Oku, A., Sawano, A., Yamaguchi, S., Yazaki, Y., and Shibuya, M. (1998). A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem* 273, 31273-31282.

Ohgane, J., Hattori, N., Oda, M., Tanaka, S., and Shiota, K. (2002). Differentiation of trophoblast lineage is associated with DNA methylation and demethylation. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 701-706.

Okada-Ban, M., Thiery, J. P., and Jouanneau, J. (2000). Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol* 32, 263-267.

Olofsson, B., Korpelainen, E., Pepper, M. S., Mandriota, S. J., Aase, K., Kumar, V., Gunji, Y., Jeltsch, M. M., Shibuya, M., Alitalo, K., and Eriksson, U. (1998). Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11709-11714.

Orlandini, M., Marconcini, L., Ferruzzi, R., and Oliviero, S. (1996). Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11675-11680.

Partanen, T. A., and Paavonen, K. (2001). Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans. *Microsc Res Tech* 55, 108-121.

Passalaris, J. D., Sepkowitz, K. A., and Glesby, M. J. (2000). Coronary artery disease and human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 31, 787-797.

Pasterkamp, G., Schoneveld, A. H., Hijnen, D. J., de Kleijn, D. P., Teepen, H., van der Wal, A. C., and Borst, C. (2000). Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteases 1, 2 and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis* 150, 245-253.

Peichev, M., Naiyer, A. J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W. J., Williams, M., Oz, M. C., Hicklin, D. J., Witte, L., Moore, M. A., and Rafii, S. (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95, 952-958.

Petito, C. K., and Cash, K. S. (1992). Blood-brain barrier abnormalities in the acquired immunodeficiency syndrome: immunohistochemical localization of serum proteins in postmortem brain. *Ann Neurol* 32, 658-666.

Pober, J. S., and Cotran, R. S. (1990). Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 70, 427-451.

Pober, J. S., Gimbrone, M. A., Jr., Lapierre, L. A., Mendrick, D. L., Fiers, W., Rothlein, R., and Springer, T. A. (1986). Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol* 137, 1893-1896.

Poli, G. (1999). Laureate ESCI award for excellence in clinical science 1999. Cytokines and the human immunodeficiency virus: from bench to bedside. European Society for Clinical Investigation. *Eur J Clin Invest* 29, 723-732.

Prakash, B., Praefcke, G. J., Renault, L., Wittinghofer, A., and Herrmann, C. (2000). Structure of human guanylate-binding protein 1 representing a unique class of GTP-binding proteins. *Nature* 403, 567-571.

Quirici, N., Soligo, D., Caneva, L., Servida, F., Bossolasco, P., and Deliliers, G. L. (2001). Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol* 115, 186-194.



Rafii, S., and Skobe, M. (2003). Splitting vessels: keeping lymph apart from blood. *Nat Med* 9, 166-168.

Redmer, D. A., and Reynolds, L. P. (1996). Angiogenesis in the ovary. *Rev Reprod* 1, 182-192.

Reed, M. J., Corsa, A. C., Kudravi, S. A., McCormick, R. S., and Arthur, W. T. (2000). A deficit in collagenase activity contributes to impaired migration of aged microvascular endothelial cells. *J Cell Biochem* 77, 116-126.

Reunanen, N., Li, S. P., Ahonen, M., Foschi, M., Han, J., and Kahari, V. M. (2002). Activation of p38 alpha MAPK enhances collagenase-1 (matrix metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) expression by mRNA stabilization. *J Biol Chem* 277, 32360-32368.

Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Roncali, L., and Dammacco, F. (2002). Endothelial cell heterogeneity and organ specificity. *J Hematother Stem Cell Res* 11, 81-90.

Risau, W. (1995a). Differentiation of endothelium. *Faseb J* 9, 926-933.

Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-674.

Risau, W., and Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 73-91.

Rohen, J. W., Lütjen-Drecoll, E. (1988). *Funktionelle Embryologie*. Schattauer Verlag.

Rokhlin, O. W., Cohen, M. B., Kubagawa, H., Letarte, M., and Cooper, M. D. (1995). Differential expression of endoglin on fetal and adult hematopoietic cells in human bone marrow. *J Immunol* 154, 4456-4465.

Rothlein, R., Dustin, M. L., Marlin, S. D., and Springer, T. A. (1986). A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol* 137, 1270-1274.

Rutter, J. L., Benbow, U., Coon, C. I., and Brinckerhoff, C. E. (1997). Cell-type specific regulation of human interstitial collagenase-1 gene expression by interleukin-

1 beta (IL-1 beta) in human fibroblasts and BC-8701 breast cancer cells. *J Cell Biochem* 66, 322-336.

Sadler, J. E. (1991). von Willebrand factor. *J Biol Chem* 266, 22777-22780.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.

Scholz, D., and Schaper, J. (1997). Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) is localized over the entire plasma membrane of endothelial cells. *Cell Tissue Res* 290, 623-631.

Schwartzkopff, B., Fassbach, M., Pelzer, B., Brehm, M., and Strauer, B. E. (2002). Elevated serum markers of collagen degradation in patients with mild to moderate dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 4, 439-434.

Seandel, M., Noack-Kunmann, K., Zhu, D., Aimes, R. T., and Quigley, J. P. (2001). Growth factor-induced angiogenesis in vivo requires specific cleavage of fibrillar type I collagen. *Blood* 97, 2323-2332.

Shearer, W. T., Reuben, J., Lee, B. N., Popek, E. J., Lewis, D. E., Hammill, H. H., Hanson, I. C., Kline, M. W., and Langston, C. (1997). Role of placental cytokines and inflammation in vertical transmission of HIV infection. *Acta Paediatr Suppl* 421, 33-38.

Shi, Q., Rafii, S., Wu, M. H., Wijelath, E. S., Yu, C., Ishida, A., Fujita, Y., Kothari, S., Mohle, R., Sauvage, L. R., Moore, M. A., Storb, R. F., and Hammond, W. P. (1998). Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92, 362-367.

Shintani, S., Murohara, T., Ikeda, H., Ueno, T., Honma, T., Katoh, A., Sasaki, K., Shimada, T., Oike, Y., and Imaizumi, T. (2001). Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 103, 2776-2779.

Sinicco, A., Biglino, A., Sciandra, M., Forno, B., Pollono, A. M., Raiteri, R., and Gioannini, P. (1993). Cytokine network and acute primary HIV-1 infection. *Aids* 7, 1167-1172.

Sleeman, J. P., Krishnan, J., Kirkin, V., and Baumann, P. (2001). Markers for the lymphatic endothelium: in search of the holy grail? *Microsc Res Tech* 55, 61-69.

Smith, C. W., Marlin, S. D., Rothlein, R., Toman, C., and Anderson, D. C. (1989). Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest* 83, 2008-2017.

Spinale, F. G., Coker, M. L., Heung, L. J., Bond, B. R., Gunasinghe, H. R., Etoh, T., Goldberg, A. T., Zellner, J. L., and Crumley, A. J. (2000). A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation* 102, 1944-1949.

Stürzl, M., Zietz, C., Monini, P., and Ensoli, B. (2001). Human herpesvirus-8 and Kaposi's sarcoma: relationship with the multistep concept of tumorigenesis. *Adv Cancer Res* 81, 125-159.

Suhardja, A., and Hoffman, H. (2003). Role of growth factors and their receptors in proliferation of microvascular endothelial cells. *Microsc Res Tech* 60, 70-75.

Sutherland, D. R. (1996). Assessment of peripheral blood stem cell grafts by CD34+ cell enumeration: toward a standardized flow cytometric approach. *J Hematother* 5, 209-210.

Sutherland, D. R., and Keating, A. (1992). The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications. *J Hematother* 1, 115-129.

Swerlick, R. A., Lee, K. H., Li, L. J., Sepp, N. T., Caughman, S. W., and Lawley, T. J. (1992). Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells. *J Immunol* 149, 698-705.

Tabib, A., Leroux, C., Mornex, J. F., and Loire, R. (2000). Accelerated coronary atherosclerosis and arteriosclerosis in young human-immunodeficiency-virus-positive patients. *Coron Artery Dis* 11, 41-46.

Takahashi, N., Kawanishi-Tabata, R., Haba, A., Tabata, M., Haruta, Y., Tsai, H., and Seon, B. K. (2001). Association of serum endoglin with metastasis in patients with

colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. *Clin Cancer Res* 7, 524-532.

Taylor, J. F., Smith, P. G., Bull, D., and Pike, M. C. (1972). Kaposi's sarcoma in Uganda: geographic and ethnic distribution. *Br J Cancer* 26, 483-497.

Thorin, E., and Shreeve, S. M. (1998). Heterogeneity of vascular endothelial cells in normal and disease states. *Pharmacol Ther* 78, 155-166.

Toneatto, S., Finco, O., van der Putten, H., Abrignani, S., and Annunziata, P. (1999). Evidence of blood-brain barrier alteration and activation in HIV-1 gp120 transgenic mice. *Aids* 13, 2343-2348.

Trattner, A., Hodak, E., David, M., and Sandbank, M. (1993). The appearance of Kaposi sarcoma during corticosteroid therapy. *Cancer* 72, 1779-1783.

Tyagi, M., Rusnati, M., Presta, M., and Giacca, M. (2001). Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 276, 3254-3261.

Ullrich, C. K., Groopman, J. E., and Ganju, R. K. (2000). HIV-1 gp120- and gp160-induced apoptosis in cultured endothelial cells is mediated by caspases. *Blood* 96, 1438-1442.

UNAIDS (2003). AIDS-epidemic update - December 2003.

Vasa, M., Fichtlscherer, S., Adler, K., Aicher, A., Martin, H., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S. (2001). Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 103, 2885-2890.

Verdegaal, E. M., Beekhuizen, H., Blokland, I., and van Furth, R. (1993). Increased adhesion of human monocytes to IL-4-stimulated human venous endothelial cells via CD11/CD18, and very late antigen-4 (VLA-4)/vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)-dependent mechanisms. *Clin Exp Immunol* 93, 292-298.

Vincenti, M. P., White, L. A., Schroen, D. J., Benbow, U., and Brinckerhoff, C. E. (1996). Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 6, 391-411.

- Voyta, J. C., Via, D. P., Butterfield, C. E., and Zetter, B. R. (1984). Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol* 99, 2034-2040.
- Wade, N. A., Birkhead, G. S., Warren, B. L., Charbonneau, T. T., French, P. T., Wang, L., Baum, J. B., Tesoriero, J. M., and Savicki, R. (1998). Abbreviated regimens of zidovudine prophylaxis and perinatal transmission of the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 339, 1409-1414.
- Wagner, D. D. (1990). Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol* 6, 217-246.
- Watt, S. M., Gschmeissner, S. E., and Bates, P. A. (1995). PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leuk Lymphoma* 17, 229-244.
- Weber, A. J., and De Bandt, M. (2000). Angiogenesis: general mechanisms and implications for rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 67, 366-383.
- Weich, H. A., Salahuddin, S. Z., Gill, P., Nakamura, S., Gallo, R. C., and Folkmann, J. (1991). AIDS-associated Kaposi's sarcoma-derived cells in long-term culture express and synthesize smooth muscle alpha-actin. *Am J Pathol* 139, 1251-1258.
- Weiss, M. J., and Orkin, S. H. (1996). In vitro differentiation of murine embryonic stem cells. New approaches to old problems. *J Clin Invest* 97, 591-595.
- Weller, P. F., Rand, T. H., Goelz, S. E., Chi-Rosso, G., and Lobb, R. R. (1991). Human eosinophil adherence to vascular endothelium mediated by binding to vascular cell adhesion molecule 1 and endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7430-7433.
- Westermarck, J., and Kahari, V. M. (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *Faseb J* 13, 781-792.
- Westermarck, J., Seth, A., and Kahari, V. M. (1997). Differential regulation of interstitial collagenase (MMP-1) gene expression by ETS transcription factors. *Oncogene* 14, 2651-2660.

Williams, A. F., and Barclay, A. N. (1988). The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* 6, 381-405.

Wilson, E. M., Moainie, S. L., Baskin, J. M., Lowry, A. S., Deschamps, A. M., Mukherjee, R., Guy, T. S., St John-Sutton, M. G., Gorman, J. H., 3rd, Edmunds, L. H., Jr., Gorman, R. C., and Spinale, F. G. (2003). Region- and type-specific induction of matrix metalloproteinases in post-myocardial infarction remodeling. *Circulation* 107, 2857-2863.

Yin, A. H., Miraglia, S., Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A. G., Olweus, J., Kearney, J., and Buck, D. W. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 5002-5012.

Yu, W. H., and Woessner, J. F., Jr. (2001). Heparin-enhanced zymographic detection of matrilysin and collagenases. *Anal Biochem* 293, 38-42.

Ziegler, B. L., Valtieri, M., Porada, G. A., De Maria, R., Muller, R., Masella, B., Gabbianelli, M., Casella, I., Pelosi, E., Bock, T., Zanjani, E. D., and Peschle, C. (1999). KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 285, 1553-1558.

Ziegler, J. L. (1993). Endemic Kaposi's sarcoma in Africa and local volcanic soils. *Lancet* 342, 1348-1351.

Zietz, C., Hotz, B., Stürzl, M., Rauch, E., Penning, R., and Lohrs, U. (1996). Aortic endothelium in HIV-1 infection: chronic injury, activation, and increased leukocyte adherence. *Am J Pathol* 149, 1887-1898.

## 7 Lebenslauf und Publikationsliste

Anita Maria Jörg

Geboren am 01.11.1958 in Landsberg am Lech

Staatsangehörigkeit: deutsch

Zweiter Bildungsweg, Studium und Promotion

Seit 7/2000 Promotion am GSF-Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, Neuherberg, Institut für Molekulare Virologie, Abt. Virale Vaskulopathie unter Leitung von Prof. Dr. Michael Stürzl.

Thema der Doktorarbeit:

Auswirkungen der maternalen HIV-1-Infektion auf die Genexpression endothelialer Vorläuferzellen und differenzierter Endothelzellen nicht-infizierter Kinder

1990 – 1997 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München

1986 – 1990 Abendgymnasium der Stadt München mit dem Abschluß der allgemeinen Hochschulreife

Berufstätigkeit

3/1999 – 6/2000 Aesculap AG & Co. KG, Mitarbeiterin des Medizinischen Referates

1987 – 1999 Krankenschwester auf der allgemeinchirurgischen Intensivstation im Universitätsklinikum Großhadern, ab Januar 1988 Teilzeitarbeit

1986 – 1987 Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke

1984 – 1986 Krankenschwester auf der allgemeinchirurgischen Intensivstation im Universitätsklinikum Großhadern

1982 - 1984 Krankenschwester auf der herzchirurgischen Intensivstation im Universitätsklinikum Großhadern

1979 – 1981 Städt. Krankenhaus München-Neuperlach, Nothilfe

### Berufsausbildung

- 1976 – 1979      Ausbildungsinstitut für Krankenpflege der Stadt München,  
Staatsexamen als Krankenschwester
- 1975 – 1976      Freiwilliges Soziales Jahr beim Deutschen Paritätischen  
Wohlfahrtsverband

### Schulbildung

- 1971 – 1975      Staatliche Realschule in Landsberg am Lech mit dem Abschluß der  
Mittleren Reife
- 1965 – 1971      Grund- und Hauptschule der Gemeinde Penzing

### Besuchte Kurse

- März 2002      Teilnahme am 15. Regensburger Kurs: Anwendung der  
Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik



## Publikationsliste

### Schriftliche Veröffentlichungen:

Guenzi E., Töpolt K., Lubeseder-Martellato C., Jörg A., Naschberger E., Benelli R., Albin A. and Stürzl M. (2003). The guanylate binding protein-1 GTPase controls the invasive and angiogenic capability of endothelial cells through inhibition of MMP-1 expression. *EMBO J.* 22: 3772-3782.

Töpolt K., Guenzi E., Lubeseder-Martellato C., Jörg A., Naschberger E. and Stürzl, M. (2002). Structure-function analysis of the anti-proliferative effect of the human guanylate binding protein-1 (GBP-1) in endothelial cells. Proceedings of the 22<sup>nd</sup> Meeting of European Society for Microcirculation. The Microcirculation and Vascular Biology, Monduzzi Editore S.p.A. Medimond Inc. 2002: 215-219.

Lubeseder-Martellato C., Guenzi E., Jörg A., Töpolt K., Naschberger E., Kremmer E., Zietz C., Tschachler E., Hutzler P., Schwemmle M., Matzen K., Grimm T., Ensoli B. and Stürzl M. (2002). Guanylate-binding protein-1 expression is selectively induced by inflammatory cytokines and is an activation marker of endothelial cells during inflammatory diseases. *AJP* 161: 1749–1759.

Guenzi E., Töpolt K., Cornali E., Lubeseder-Martellato C., Jörg A., Matzen K., Zietz C., Kremmer E., Nappi F., Schwemmle M., Hohenadl C., Barillari G., Tschachler E., Monini P., Ensoli B., and Stürzl M. (2001). The helical domain of GBP-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation by inflammatory cytokines. *EMBO J.* 20: 5568-5577.

### Vortrag:

Juli 2003	Teilnahme am 4. Symposium für Endothelzellbiologie in München: Molecular cell biology of the endothelium in development and diseases.  „Impaired Expression of MMP-1 in Endothelial Precursor Cells and HUVEC of Infants Born to HIV-1-infected Women”
-----------	--

## **8 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Stürzl für die Vergabe des interessanten Themas dieser Doktorarbeit, die vielseitige Unterstützung und den Rückhalt in schwierigen Situationen. Durch sein umfangreiches Wissen und sein Engagement war er maßgeblich am Gelingen der Arbeit beteiligt.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Priv. Doz. Dr. Ruth Brack-Werner für die Vertretung der Arbeit an der LMU München, Fakultät für Biologie bedanken, für ihr Interesse am Fortgang der Arbeit und ihre aufmunternden Worte.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Virale Vaskulopahtie Dr. Eric Guenzi, Dr. Thomas Grimm, Dr. Kathrin Matzen, Kristin Töpol, Dr. Clara Lubeseder-Martellato, Elisabeth Naschberger, Frank Pogoda und René Leubert für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Kollegialität. Darüber hinaus möchte ich Eric und Thomas für die hilfreichen Diskussionen und wertvollen Tipps danken, die entscheidend zur Lösung diverser Fragestellungen beitrugen.

Des weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. Thomas Grubert, Gynäkologische Klinik der LMU München, Innenstadtkliniken, für die Kooperation und die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials.

Dr. Robert Oostendorp und Dr. Ulrich Keller, III. Medizinische Abteilung, TU München, danke ich für die EPC.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihr Verständnis und ihre Unterstützung während der Zeit meiner Promotion bedanken.